

Aus der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive  
Zahnheilkunde  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg / Saar  
(Direktor Prof. Dr. Matthias Hannig)

---

Elektrophoretische Untersuchungen der  
Speichelproteinadsorption (und initialen Biofilmbildung)  
auf Festkörperoberflächen in der Mundhöhle

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS  
DER ZAHNHEILKUNDE

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2009

vorgelegt von Mario Weyland

geb. am 12 Mai 1972 in Püttlingen

Tag der Promotion:

Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Hannig

2. Berichterstatter: Prof. Dr.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>7 - 10</b>
1.1	Summary	11 - 14
<b>2.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>15 - 57</b>
2.1	Einführung in die Thematik	15
2.2	Bioadhäsionsprozesse in der Mundhöhle	15 - 16
2.3	Pellikelbildung	16 - 21
2.4	Pellikelbildung in Abhängigkeit von der intraoralen Lokalisation	21 - 23
2.5	Pellikelbildung und bakterielle Adhärenz	23 - 26
2.6	Ultrastruktur der Pellikel	26 - 30
2.7	Funktion und Bedeutung der Pellikel	31
2.7.1	„Lubrikant“ an der Zahnoberfläche	31
2.7.2	Semipermeable Membran	32 - 34
2.7.3	Die Bedeutung der Pellikelreifung für ihre schützenden Eigenschaften	34 - 35
2.7.4	Mineralhomöostase	35
2.7.5	Modulation der bakteriellen Adhärenz	36
2.7.6	Antibakterielle Eigenschaften	36
2.8	Biochemische Zusammensetzung der Pellikel	37 - 38
2.8.1	Proteine	38 – 40
2.8.1.1	Prolinreiche Proteine (PRP`s)	41
2.8.1.2	Statherin	41
2.8.1.3	Histatin	42
2.8.1.4	$\alpha$ -Amylase	42
2.8.1.5	Glykosyltransferasen (Isoformen B, C, D)	42
2.8.1.6	Carboanhydrasen	42 - 43
2.8.1.7	Lysozym	43
2.8.1.8	Laktoferrin	44
2.8.1.9	Hochmolekulare Muzine MG-1 und MG-2	44
2.8.1.10	Cystatine	45
2.8.1.11	Albumin	45
2.8.1.12	Immunglobuline sIgA, IgG und IgM	45
2.8.1.13	Komplementfaktoren 3 und 3c	46

2.8.1.14	Fibrinogen	46
2.8.1.15	Fibronectin	46
2.8.1.16	Agglutinin	46
2.8.1.17	Neue Untersuchungsmethoden zur Proteinanalyse	47 - 48
2.8.2	Aminosäuren	48 - 49
2.8.3	Kohlenhydrate	49
2.8.4	Lipide	50
2.9	Pellikelbildung und bakterielle Adhärenz auf verschiedenen Festkörperoberflächen	50 - 52
2.10	Methoden der <i>In-vivo</i> -Pellikelgewinnung	52 - 53
2.11	Forschungsansätze	54 - 55
2.12	Fragestellung	56 - 57
<b>3.</b>	<b>Probanden, Material und Methodik</b>	<b>58 - 93</b>
3.1	Probanden	58
3.2	Materialien und prinzipielle Verwendung	59 - 61
3.3	Methodik	61
3.3.1	Herstellung der Prüfkörpertrageschienen	61 - 62
3.3.2	Herstellung der Prüfkörper	62 - 64
3.3.3	Vorbereitende Maßnahmen	65 - 66
3.3.4	Bestückungsplanung	66
3.3.5	Montage der Prüfkörper	67
3.3.6	Gewinnung der Pellikel	68 - 70
3.3.7	Poolen	70
3.3.8	Proteingewinnung	71 - 73
3.3.9	Herstellung der Vollspeichelproben, TCA-Fällung	74 - 76
3.4	High-Tris-Gelelektrophorese, Coomassie- und Silberfärbung	76
3.4.1	Gießen der 15%igen High-Tris-Gele	77
3.4.1.1	Bodengel	78
3.4.1.2	Trenngel	79 - 80
3.4.1.3	Sammelgel	81 - 82
3.4.2	Vorbereitung und Elektrophorese	82 - 85
3.4.3	Coomassiefärbung	85 - 87
3.4.4	Silberfärbung	88
3.4.4.1	Färbeprogramm	88 - 89

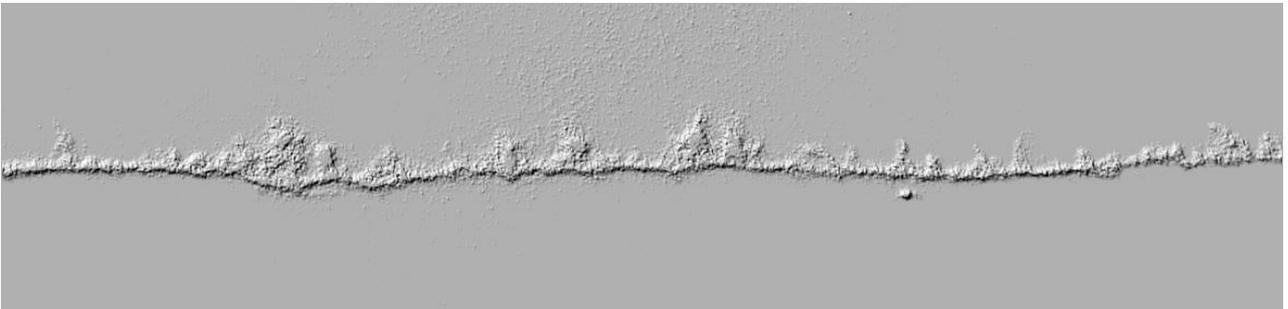
3.4.5	Archivierung	89 - 90
3.5	Auswertung	90 - 91
3.6	Beispiele für elektrophoretische Auftrennung von 3 min-Pellikelproben	92
3.7	Statistische Analyse	93
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>94 - 131</b>
4.1	Gelelektrophoretisches Bandenmuster der Pellikelproben	94 - 99
4.2	Gelelektrophoretisches Bandenmuster der Speichelproben	99 - 102
4.3	Analysetabellen	103 - 105
4.4	Bandenanzahl der elektrophoretisch separierten Pellikelproben	105 - 117
4.5	Molekulargewichte der Probandengele	118 - 121
4.6	Bandenanzahl der Speichelproben	122
4.7	Molekulargewichte der Speichelproben	123
4.8	Statistische Auswertung	124
4.8.1	Analyse der Einflussvariablen	124
4.8.1.1	Geschlecht	124
4.8.1.2	Lokalisation	124
4.8.1.3	Zeit	124 - 125
4.8.2	Auswertung der Vollspeichelproben	126 - 130
4.8.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	131
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>132 - 157</b>
5.1	Material und Methoden	132
5.1.1	Prüfkörperherstellung	132
5.1.2	Die partielle Minioplastschiene als Prüfkörperträger	133
5.1.3	Versuchsbedingungen während der intraoralen Exposition	134
5.1.4	Einfluss probandenspezifischer Faktoren auf die Pellikelbildung	135
5.1.5	Einfluss der Tageszeit und der Maturation auf die Pellikelbildung	136 - 137
5.1.6	Einfluss der Lokalisation auf die Pellikelbildung	137 - 138
5.1.7	Methodik zur Pellikelgewinnung und –aufbereitung	139 -140
5.1.8	Elektrophorese, Gelfärbung und Auswertung mit ImageMaster™1D	141 - 144
5.1.9	Interpretation der Elektrophoresegele	144
5.2	Ergebnisse	145

5.2.1	Einfluss werkstoffspezifischer Faktoren auf Pellikelbildung und bakterielle Adhärenz	144 - 149
5.2.2	Einfluss der Materialoberflächen auf die Pellikelbildung und die bakterielle Adhärenz	150 - 152
5.2.3	Bandenanzahl und – verteilung	152 - 155
5.2.4	Molekulargewichte	155 – 156
5.2.5	Schlussfolgerung und Ausblick	156 - 157
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>158 - 203</b>
<b>7.</b>	<b>Dank</b>	<b>204</b>
<b>8.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>205 - 206</b>
<b>Anhang 1</b>	<b>Materialliste</b>	<b>207 - 212</b>
<b>Anhang 2</b>	<b>Gelbilder</b>	<b>213 - 231</b>
<b>Anhang 3</b>	<b>Aufklärungsbogen</b>	<b>232</b>
<b>Anhang 4</b>	<b>Einverständniserklärung</b>	<b>233</b>
<b>Anhang 5</b>	<b>Befundbogen</b>	<b>234</b>
<b>Anhang 6</b>	<b>TEM-Bildersammlung</b>	<b>235 - 236</b>
<b>Anhang 7</b>	<b>Erklärung an Eides statt</b>	<b>237 – 238</b>
<b>Anhang 8</b>	<b>Publikation</b>	<b>239</b>

„Alles meinem Gott zu Ehren,  
in der Arbeit in der Ruh!  
Gottes Lob und Ehr zu mehren  
ich verlang und alles tu.  
Meinem Nächsten stets zu helfen,  
gern zu dienen Jedermann,  
gib o Jesu Gnad dazu!

frei nach Gotteslob Nr. 615

Text: Duderstadt 1724 mit Ergänzungen von mir selbst



Modifiziertes TEM-Bild 30-Minuten-Pellikel, Oberkiefer Seitenzahngebiet

(W. Hoth-Hannig)

Gewidmet meiner Familie

## 1. Zusammenfassung

Auf allen intraoralen Festkörperoberflächen kommt es innerhalb kürzester Zeit zur Ausbildung einer Pellikelschicht, deren Grundlage die Adsorption von Proteinen, Glykoproteinen und Makromolekülen aus z.B. Speichel, Sulcusfluid, Blutplasmaexsudaten, mikrobiellen Proteinen oder auch Nahrungsbestandteilen ist. Diese stellt die Grundlage zur Bildung eines Biofilms dar, der sowohl protektive Eigenschaften, wie z.B. Erosionsschutz, Lubrikation, Mineralhomöostase und antibakterielle Eigenschaften aufweist, als auch pathogene Charakteristika besitzt, wie z.B. Fähigkeit zur bakteriellen Adhärenz (Säureproduktion), Ausbildung einer dreidimensional strukturierten Plaque auf der primär adsorbierten Pellikelbasisschicht, die ursächlich für die Entstehung von Karies und Parodontopathien ist.

Vorrangiges Ziel zur Entwicklung prophylaktischer Therapieansätze ist die Inhibition der Ausbildung einer pathogenen Plaque bzw. die Verbesserung der protektiven Eigenschaften des oralen Biofilms.

Dazu sind umfassende Grundlagenforschungen nötig, um die Biofilmbildung auf den verschiedenen Festkörperoberflächen, die Mechanismen der Biofilmbildung und die nachfolgende bakterielle Adhärenz selbst zu ergründen. Nur auf dieser Grundlage ist die Entwicklung von neuen Therapieansätzen möglich.

Das Ziel der vorliegenden klinisch-experimentellen *In-vivo*-Studie bestand darin, das elektrophoretische Bandenmuster des *in vivo* auf 10 verschiedenen Werkstoffen zu 3 verschiedenen Zeiten an 2 unterschiedlichen Expositionsorten gebildeten Biofilms und das adsorbierte Bandenspektrum mit dem des Vollspeichels in unterschiedlichen Aufbereitungsschritten miteinander zu vergleichen und zu analysieren. Dabei sollten folgende Fragen geklärt werden:

- Gibt es Unterschiede oder Veränderungen in der Bandenverteilung und des Bandenspektrums hinsichtlich der Anzahl und des Molekulargewichts zwischen den einzelnen Werkstoffen, Lokalisationen, Zeiten und Geschlechtern?

- Wie verändert sich das Bandenspektrum der Werkstoffe beim einzelnen Probanden innerhalb der Expositionszeiten und den Lokalisationen?
- Sind die Veränderungen im Bandenspektrum probanden-, werkstoff-, zeit-, lokalisations- oder geschlechtsspezifisch?
- Sind alle Banden im Speichelgel auch im Probengel vertreten, oder adsorbiert nur ein bestimmtes Spektrum der im Vollspeichel enthaltenen Biomoleküle auf den Prüfkörperoberflächen?
- Ist die Bandenverteilung innerhalb der Probanden gleich, oder hat jeder Proband sein eigenes Speichelprofil und zeichnet sich dieses auch auf den Werkstoffen ab?
- Wie verändert sich das Bandenmuster der Vollspeichelproben durch die unterschiedlichen Reinigungsstufen?
- Welche Banden lassen sich dadurch möglichen Verunreinigungen wie z.B. Mikroorganismen zuordnen und sind damit auch bei den Probengelen als solche einzustufen?

Sechs gesunde Probanden (3 männliche und 3 weibliche) trugen über Zeiträume von 3-, 30- und 120 Minuten partielle Minioplastschienen. Auf den zur Wange (bukkal) und zum Gaumen (palatinal) im Oberkieferseitenzahnbereich gelegenen Flächen wurden jeweils 4 Prüfkörper eines Werkstoffes auf beiden Seiten montiert. Die Studie wurde mit 10 verschiedenen Werkstoffen (Goldlegierung, Keramik, Prothesenkunststoff, Teflon, Rinderschmelz, Komposit, Glasionomerezement, Amalgam, Glas und Titan) durchgeführt. Die Prüfkörper wurden poliert, gereinigt und desinfiziert. Nach der jeweiligen intraoralen Expositionszeit wurden die bestückten Schienen mit destilliertem Wasser abgespült und die Prüfkörper vorsichtig abgenommen. Zur Gewinnung der Pellikelproteine wurden die Prüfkörper mittels SDS getränkten Schwämmchen abgewischt. Die Schwämmchen wurden mit Lämmli-Puffer aufbereitet, die Proteinlösung abzentrifugiert und denaturiert. Die Vollspeichelproben jedes einzelnen Probanden wurden in 3 unterschiedlichen Reinigungsstufen verwendet (pur mit Lämmli-Puffer, ultrazentrifugiert mit Lämmli-Puffer und ultrazentrifugiert mit anschließender TCA-Fällung und Lämmli-Puffer). Die Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt, die gefärbten Gele eingescannt und mit einer speziellen Software analysiert.

Eine exakte Analyse aller einzelnen Banden war technisch nicht möglich.

Die Gele zeigten bis zu 65 Proteinbanden zwischen 6,1 und 334,37 kDa unterschiedlichster Dicke und Farbintensität.

Zur statistischen Analyse wurden die Elektropherogramme in 16 Molekulargewichtsintervalle eingeteilt und die Anzahl der Banden innerhalb der jeweiligen Intervalle gezählt.

Es konnten dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Probanden festgestellt werden.

Die Mittelwerte der Gesamtbandenanzahlen lagen bei 42,1 vs. 42 (t-Test,  $p=0,83$ ).

Bei der Einzelanalyse der 16 Intervalle ergab sich, dass bei 11 Intervallen mehr Banden auf bukkalen als auf palatinalen Lokalisationen, und bei 5 Intervallen mehr Banden palatinal als bukkal gefunden worden waren. Dadurch zeigte sich eine Tendenz zu höheren Bandenanzahlen auf bukkalen Lokalisationen als auf palatinalen aber ohne statistische Signifikanz.

Es ließen sich keine allgemeingültigen Unterschiede hinsichtlich Bandenanzahl, -verteilung und Molekulargewichte innerhalb der einzelnen Werkstoffe feststellen.

Bandenmuster und die Verteilung waren intra- und interindividuell signifikant verschieden ( $p \leq 0,001$ ).

Die Bandenanzahl nahm innerhalb der Zeiten (3 min, 30 min 120 min) signifikant zu ( $p \leq 0,001$ ).

Bandenmuster, -anzahl und Molekulargewichte der Schmelzproben als Referenz zu den übrigen Proben ergab keine signifikanten Unterschiede, nur der Faktor Proband war wiederum signifikant ( $p \leq 0,001$ ).

Innerhalb eines Individuums gab es Unterschiede bezüglich der Werkstoffe, Lokalisationen und Zeiten. Diese glichen sich aber bei der Gesamtbetrachtung aller Probanden wiederum aus.

Innerhalb der unterschiedlichen Reinigungsstufen der Vollspeichelproben und auch im Vergleich der Bandenanzahl mit denen der Werkstoffproben waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Es kann davon ausgegangen werden, dass die im Speichel enthaltenen Proteine auch in der auf den Werkstoffoberflächen gebildeten Pellicel enthalten sind, und die Proteinadsorption daher nicht als selektiver Prozess bezeichnet werden kann.

### **Ausblick:**

Mittels 2D-Elektrophorese, durch Variierung der Gelgradienten oder Modifizierung der Probenentnahme könnten noch mehr Proteinbanden detektiert werden. Zum Großteil kann bei den dann auf gleicher Molekulargewichtshöhe auftauchenden Banden von Denaturationsderivaten der jeweiligen Proteine ausgegangen werden.

Auch eine exakte Bestimmung und Identifizierung aller einzelnen Banden und die Feststellung, ob spezielle Banden bei einzelnen Werkstoffen fehlen, könnte evtl. noch interessante Aspekte liefern.

Grundsätzlich ist aber eher davon auszugehen, dass durch die Entwicklung neuer Materialien im nanostrukturellen Bereich eine Verminderung der Plaqueakkumulation in der Mundhöhle erreicht werden kann. Dabei darf nicht vergessen werden, dass durch die Verbesserung der individuellen Mundhygiene und das veränderte Prophylaxebewusstsein die Kariesinzidenz heute auf ihrem niedrigsten Stand seit Beginn der Beobachtung angelangt ist. Die optimale Mundhygiene ist durch nichts zu ersetzen und stellt die beste Prävention dar.

## 1.1 Summary

### Electrophoretical investigations of salivary protein adsorption (and initial biofilm formation) on solid surfaces in the oral cavity

On all solid surfaces exposed intraorally, an acquired salivary pellicle layer is formed within seconds by adsorption of proteins, glycoproteins and other macromolecules from e. g. saliva, gingival crevicular fluid, blood plasma exudates, microbial proteins or also food components. The pellicle layer represents the first stage of biofilm formation and exhibits both, protective characteristics such as protection against erosion, lubrication, mineral homeostasis and antibacterial properties, as well as pathogenic characteristics, such as bacterial adherence on the primarily adsorbed pellicle layer and formation of a three-dimensionally structured plaque, that causes caries and periodontal disease.

One major goal regarding the development of preventive strategies is inhibition of the formation of a pathogenic plaque and / or improvement (enhancement) of the protective properties of the oral biofilm.

For this purpose comprehensive basic research is necessary, in order to elucidate the process of biofilm formation on different solid surfaces, the mechanisms of protein adsorption and the subsequent bacterial adherence. Based on this knowledge the development of new therapeutic strategies will be possible.

The aim of the present experimental *in vivo* study was to analyse the pattern of electrophoretically separated protein bands from the biofilm formed *in vivo* on 10 different materials at 3 different times at 2 different intraoral sites in comparison to the spectrum of adsorbed protein bands from whole saliva after different treatment steps. The following questions should be clarified:

## 1.1 Summary

---

- Are there any differences or changes in the distribution and the spectrum of protein bands regarding the number and the molecular weight between the individual materials, sites, times and sexes?
- How does the spectrum of protein bands adsorbed on the various materials change within the individual subjects dependent on the intraoral exposure times and sites?
- Are there specific changes in the spectrum of protein bands with regard to subjects, materials, exposure times, intraoral sites or sex of volunteers?
- Are all protein bands represented in the gel of saliva samples also detectable in the gel of material specimens, or is only a certain spectrum of the biomolecules contained in the full saliva adsorbed on the material surfaces?
- Is the distribution of bands similar within the probands, or has each subject an individual profile of salivary proteins and is this reflected in the spectrum of proteins adsorbed on the various materials?
- How does the pattern of protein bands from the whole saliva samples change according to the different stages of cleaning / purification?
- Which protein bands can thereby be assigned as possible impurities, e. g. from microorganisms, and, thus, are also detectable within the gel of material specimen?

Six healthy volunteers (3 male and 3 female) carried partial acrylic splints over periods of 3 -, 30 - and 120 min. In each experimental trial four specimens of the respective materials were mounted to the buccal and palatal sites of the splints in the area of the upper molar teeth. The study was accomplished with 10 different materials (gold alloy, ceramics, prosthetic resin, teflon, bovine enamel, composite, glasionomer cement, amalgam, glass and titanium). The specimens were polished, cleaned and disinfected. After the respective intraoral exposure time the splints were rinsed off with distilled water and the specimens were carefully removed. For collecting of the pellicel proteins the material surfaces were rubbed off by means of SDS soaked foam sponges. The foam sponges were treated with Laemmli buffer, and centrifuged to separate the proteins. The whole saliva samples from each individual subject were used after 3 different cleaning stages (treated only with Laemmli buffer, treated by ultracentrifugation with Laemmli buffer, or treated by ultracentrifugation with subsequent TCA precipitation and Laemmli buffer). The

## 1.1 Summary

---

proteins were separated electrophoretically, the stained gels were scanned and analysed by use of a special software.

An accurate analysis of all individual bands was technically not possible.

All gels revealed up to 65 protein bands between 6,1 and 334,37 kDa of different thickness and chroma intensity.

For statistical analysis the protein bands were divided into 16 molecular weight intervals, and the number of bands within the respective intervals was counted.

Thereby, no significant differences between male and female volunteers could be detected.

The mean values of the total number of bands were 42,1 vs. 42 (t-test,  $p=0,83$ ).

Statistical analyses of the 16 molecular weight intervals indicated that within 11 intervals more protein bands were detected on buccal than on palatal sites, and within 5 intervals more bands were found on palatal sites compared to buccal sites. Thus, in tendency a higher number of bands was detectable on buccal sites, however without statistical significance.

No general difference regarding the number, distribution and molecular weights of bands dependent on the different materials could be determined.

However, the pattern and distribution of bands revealed intra- and inter-individual differences that were statistically significant ( $p < 0.001$ ).

The number of bands increased significantly ( $p < = 0.001$ ) dependent on the time of intraoral exposure (3 -, 30 -, 120 min).

The pattern, number and molecular weights of protein bands found on the enamel specimens (as reference surface) did not differ significantly from those of protein bands detected on the other 9 materials. However, the subject-dependent differences showed statistical significance ( $p < 0.001$ ).

Within an individual, there were differences concerning the different materials, intraoral sites and exposure times. These differences adjusted themselves, however, when considering and viewing the data of all subjects.

Within the different cleaning stages of the whole saliva samples, and also when comparing the number of salivary bands with those of the pellicle samples from the different materials no significant differences could be recognized. Thus, it can be assumed that the proteins contained in the saliva are also contained in the pellicle formed on the surfaces of different solid materials, and, therefore the intraoral protein adsorption cannot be designated as selective process.

### **Outlook:**

By means of 2D-electrophoresis, by varying the gel gradients or modification of the collecting methods more protein bands might be possibly detected. However, the majority of additionally detected bands emerging at the same molecular weight level will result from denaturated derivatives of the respective proteins.

Also an accurate determination and identification of all individual bands and the observation, whether single bands are missing on individual materials, could provide new and interesting insights in the process of intraoral protein adsorption.

It can be assumed that control and reduction of biofilm formation in the oral cavity might be achieved in future by the development of new materials based on nanotechnology. Nevertheless, it should be kept in mind that the low caries incidence observed today is strongly related to an improvement of the individual oral hygiene as well as the changed prophylactic awareness of population. Optimal oral hygiene is essential for oral health (prevention of caries and periodontitis), and cannot be replaced by other measures of prophylaxis.

## 2. Einleitung

### 2.1 Einführung in die Thematik

Die intraorale Proteinadsorption auf der Zahnschmelzoberfläche (Pellikelbildung) ist bislang schon umfangreich untersucht worden (Al-Hashimi und Levine 1989, Bennick et al. 1983, Carlén et al. 1998, Carlén et al. 2003, Hannig M 1999, Kousvelari et al. 1980, Lamkin et al. 2001, Li et al. 2003, Schüpbach et al. 2001, Skjørland et al. 1995, Vacca Smith und Bowen 2000, Siqueira et al. 2007, Vitorino et al. 2008). Weitergehende systematische Studien zur Pellikelbildung auf dentalen Restaurations- und Implantatwerkstoffen und anderen Materialien liegen dagegen bis dato nur in äußerst begrenztem Umfang vor (Hannig M 1997).

Zur Beantwortung der Fragestellung, inwieweit die initiale Pellikelbildung und die nachfolgende bakterielle Adhärenz auf dentalen Restaurationswerkstoffen evtl. durch werkstoffspezifische Eigenschaften beeinflusst werden könnten, sind detaillierte Kenntnisse der Bioadhäsionsprozesse auf den unterschiedlichsten Materialien eine wichtige Grundlagenvoraussetzung.

Würde sich der Nachweis erbringen lassen, dass intraorale Bioadhäsionsprozesse einer werkstoffabhängigen Beeinflussung unterlägen, könnte dies dazu verwendet werden, durch zielgerichtete Veränderung der Oberflächeneigenschaften oder durch den Einsatz bestimmter Materialien limitierend auf die Bildung eines pathogenen Biofilms auf zahnärztlichen Werkstoffen einzuwirken. Die genaue Kenntnis der initialen Bioadhäsionsprozesse in der Mundhöhle ist für die Entwicklung neuer Prophylaxe- und Therapiekonzepte zur Vermeidung der bakteriellen Adhärenz und den damit verbundenen Folgeerscheinungen wie z. B. Karies und Parodontitiden von grundlegender Bedeutung (Hannig M 1998).

### 2.2 Bioadhäsionsprozesse in der Mundhöhle

In biologischen Systemen, und damit auch in der Mundhöhle, kommt es an der Grenzfläche zwischen Festkörpern und Flüssigkeiten zur Ausbildung eines Biofilms. Die Grundlage für die spätere bakterielle und zelluläre Adhärenz bildet die initiale Proteinadsorption (Gristina 1987).

Proteine weisen aufgrund ihrer polaren und apolaren Gruppen und aufgrund verschiedenartiger Seitenketten ein ausgeprägtes amphiphiles Verhalten auf, was ihnen die Adsorption und Konzentration an Grenzflächen ermöglicht (Horbett 1982).

Zu den typischen Adsorptionsprozessen und Grenzflächenreaktionen von Proteinen im menschlichen Körper gehören beispielsweise der Surfactant Faktor der Lunge, der Aufbau von Biomembranen, Erkennungsprozesse an Zelloberflächen oder die initiale Proteinadsorption an Fremdkörperoberflächen als Beginn der Thrombusbildung im Blut (Hoffmann 1982).

Da elektrostatische Interaktionen, hydrophobe Wechselwirkungen, van-der-Waals-Kräfte, Konformationsänderungen der Proteine sowie die Reduktion der Grenzflächenenergie zwischen fester und flüssiger Phase zur Adsorption von Biopolymeren an einer intraoral exponierten Festkörperoberfläche beitragen können, besitzen nicht nur Zahnhartsubstanzen, sondern auch Restaurationswerkstoffe trotz unterschiedlicher physikalischer Oberflächeneigenschaften die Fähigkeit zur Pellikelbildung beim Kontakt mit dem Speichel (Carlén et al. 2001, Hannig M 1997, Hannig M et al. 2004, Jendresen und Glantz 1981, Lindh 2002, Sønju und Glantz 1975 und 1976, Hannig C und Hannig M 2009).

### **2.3 Pellikelbildung**

Die Bildung der Pellikel in der Mundhöhle ist das Resultat der Biopolymeradhäsion, also der Adsorption von Proteinen und anderer Makromoleküle aus Speichel, Sulcusfluid, Blut und u. U. aus Nahrungsbestandteilen an der Zahnoberfläche bzw. auch an allen anderen Festkörperoberflächen (Armstrong 1967, Leach et al. 1967, Mayhall 1970, Sønju und Rølla 1973, Sønju et al. 1974, Mayhall 1975, Mayhall 1977, Kousvelari et al. 1980, Bennick et al. 1983, Embery et al. 1986, Rykke et al. 1990, Vacca Smith und Bowen 2000, Norde 1984, Hannig M 1997, Lendenmann et al. 2000).

Bislang galt die Pellikelbildung als ein in hohem Maße selektiver Prozess, da nur ein Teil der Proteine, die im Vollspeichel enthalten sind, in der Pellikel gefunden worden waren (Hay 1967, Yao et al. 2003, Hannig C et al. 2005, Hannig M und Joiner 2006, Carlén et al. 1998). Allerdings konnte aktuell von Siqueira et al. (2007) gezeigt werden, dass deutlich mehr der im Speichel enthaltenen Proteine in der in vivo gebildeten Pellikel enthalten sind, als bisher angenommen wurde.

Die Pellikel unterscheidet sich deutlich vom mikrobiellen Biofilm, der sog. Plaque.

Im flüssigen Milieu biologischer Systeme existiert eine Vielzahl von Biopolymeren, die mit größerer Geschwindigkeit als die anwesenden Mikroorganismen und Zellen diffundieren. Die Adhärenz von Bakterien und Zellen an Festkörperoberflächen wird durch die Charakteristika der zuvor adsorbierten Biopolymerschicht bestimmt.

Erst aus der bakteriellen Akkumulation an der Pellikeloberfläche resultiert die Bildung der Plaque, wodurch dann Karies und Parodontitiden entstehen können.

1839 beschrieb Alexander Nasmyth erstmals eine häutchenartige Schicht (Nasmythsche Membran), die mittels Säure von der Zahnoberfläche abgelöst werden kann (Nasmyth 1839).

Die Beobachtung, dass die Pellikel auch von Amalgamfüllungen und abradierten Zähnen zu gewinnen war, ließ Chase (1926) und Frank (1949) darauf schließen, dass diese Struktur erst nach dem Zahndurchbruch entsteht und nicht embryonalen Ursprungs ist.

Die Bezeichnung „erworbene Pellikel“ (acquired pellicle, pellicula dentis) wurde erstmals in einem Review zur Überarbeitung der Bezeichnungen der „exogenen Zahnbeläge“ von Dawes et al. (1963) vorgeschlagen, um das kutikuläre, also häutchenartige Material, als erworbene, azelluläre und bakterienfreie Struktur zu beschreiben, die sich, in Abgrenzung zu embryologischen Membranstrukturen, nach dem Zahndurchbruch auf der Schmelzoberfläche bildet.

Das Initialstadium der Pellikelbildung ist durch eine spontane Adsorption der Speichelproteine an der Schmelzoberfläche gekennzeichnet. Diese erste Phase beruht auf direkten physiko-chemischen Interaktionen zwischen Speichelbiopolymeren und der Festkörperoberfläche und führt zur Ausbildung einer elektronendichten Pellikelbasisschicht. Dieser Prozess beginnt innerhalb von Sekunden und nimmt insgesamt nur wenige Minuten in Anspruch (Vacca Smith und Bowen 2000, De Jong et al. 1984, Hannig M 1999, Skjørlund et al. 1995, Hannig M et al. 2004). Die Schichtdicke dieser Initialschicht variiert zwischen 10 und 20 nm.

Der erste Schritt der Pellikelbildung kann durch die Adsorption bestimmter Proteine an der Schmelzoberfläche erklärt werden. In Verbindung mit der wässrigen Elektrolytlösung des Speichels haben die Kalziumionen der Schmelzkristallite eine stärkere Tendenz, sich im Speichel zu lösen als die Phosphationen. Infolgedessen erzeugen die restlichen Phosphationen der Schmelzoberfläche eine insgesamt negative Oberflächenladung. Diese Oberfläche wird mit einer entgegengesetzt

geladenen Schicht positiver Kalziumionen besetzt. An der Schmelzoberfläche werden demzufolge Speichelproteine vorwiegend wegen der elektrostatischen Interaktion zwischen der doppelten Ionenschicht (Kalzium- und Phosphationen) einerseits und den entsprechend entgegengesetzt geladenen Gruppen der Proteine andererseits adsorbiert (Hay 1973, Bennick et al. 1979).

Bekannte Speichelproteine, die eine hohe Affinität zum Hydroxylapatit besitzen, werden „Pellikel-Präkursoren“, also Vorläuferproteine, genannt (Vitkov et al. 2004).

Diese Pellikel-Vorläufer-Proteine stammen aus den glandulären und nichtglandulären Sekretionen der Speicheldrüsen, die Bestandteile des Vollspeichels sind.

Phosphoproteine mit einer hohen Affinität zum Hydroxylapatit, wie z.B. Statherin, Histatin und prolinreiche Proteine, gehören zu den ersten Proteinen, die aus dem glandulären Speichel auf die Hydroxylapatitoberfläche adsorbieren (Hay 1973).

Diese Proteine sind nicht zu Austauschreaktionen mit den Phosphationen des Zahnschmelzes befähigt (Embery et al. 1986, Hay 1967, Hay 1973).

In neueren Studien (Vacca Smith 2000, Stigler et al. 2003) konnte gezeigt werden, dass die initiale Pellikelschicht, die *in situ* innerhalb eines Zeitraumes von 30 Sekunden bis 3 Minuten gebildet wird, einen komplizierteren und heterogeneren Aufbau besitzt, als bislang angenommen wurde.

Mehr als 10 verschiedene Proteine sind in der initialen Pellikelschicht mittels Elektrophorese und Western-Blot-Technik entdeckt worden (Vacca Smith 2000, Stigler et al. 2003, Al-Hashimi und Levine 1989, Hannig C et al. 2004, Hannig C et al. 2005), dazu zählen die muzinen Glykoproteine I und II, Amylase, Histatin, Statherin, einige Isoformen des Cystatins, Lysozym, Laktoferrin, Carboanhydrasen I und II sowie bakterielle Glycosyltransferasen. Yao et al. (2001, 2003) und Li et al. (2004) fanden auch die Immunglobuline sIgA, IgG und IgM in der Pellikel. Das Vorkommen der Phosphoproteine (PRP`s, Histatin und Statherin) in der frühen Pellikel beruht auf den direkten Interaktionen zwischen Proteinen und der Schmelzoberfläche. Aufgrund der Tatsache, dass ein breites Spektrum der unterschiedlichsten Proteine in der initialen Pellikelschicht nachweisbar ist, scheint es sehr unwahrscheinlich, dass nur elektrostatische Interaktionen das Ausgangsstadium der Pellikel bestimmen. Zusätzlich zu den elektrostatischen Kräften tragen andere Kräfte, wie van-der-Waals`sche Kräfte und Dipol-Dipol-Interaktionen (London`sche Dispersionkräfte, Debye-Kraft) zur Proteinadsorption an der Schmelzoberfläche bei.

## 2. Einleitung

---

Es wurde auch postuliert, dass hydrophobe Wechselwirkungen eine Rolle bei der Pellikelbildung spielen könnten. Diese Interaktionen werden thermodynamisch reguliert als Ergebnis eines Entropiegewinns, der sich daraus ergibt, wenn ein Protein strukturierte Wassermoleküle an einer Oberfläche ersetzt (Vassaliakos et al. 1992 und 1993).

Der schnellen Initialphase der Speichelproteinadsorption folgt eine zweite, verhältnismäßig langsame Adsorptionsphase auf der proteinbedeckten Schmelzoberfläche. Das zweite Stadium der Pellikelbildung ist durch eine kontinuierliche Biopolymeraufnahme aus dem Speichel gekennzeichnet, bei der es zu einer Zunahme der Pellikeldicke unter Bildung einer locker formierten, globulär oder granulär strukturierten Schicht kommt (Hannig M 1999).

Dieser Prozess beinhaltet Protein-Protein-Interaktionen zwischen den bereits adsorbierten und fest in die Pellikel integrierten Proteinen sowie Proteinen und Proteinaggregaten aus dem Speichel. Aminosäure- und Augeranalysen der Pellikelschicht von bukkal getragenen Schmelzplättchen (Skjørland et al. 1995) zeigten, dass die adsorbierten Proteine ihre initiale Schichtdicke in ungefähr 2 bis 3 Minuten erreicht haben. Diese Schichtdicke verändert sich dann innerhalb von 30 Minuten nicht mehr. Die Pellikeldicke nimmt dann anschließend um das dreifache ihres Ausgangswertes zu und erreicht ein Maximum nach ca. 30 bis 90 Minuten (siehe Tab. 1) (Sønju und Rølla 1973, Skjørland et al. 1995, Kuboki et al. 1987). Innerhalb von 60 Minuten wuchs die Pellikelschichtstärke in situ auf Werte zwischen 100 und 1000 nm (Hannig 1999, Amaechi et al. 1999) in Abhängigkeit von der lokalen Speichelbiopolymerkonzentration und den vorherrschenden intraoralen Bedingungen an (Hannig M 1999, Amaechi et al. 1999, Hannig M 1997).

Tab. 1: Dicke von in vivo gebildeten Pellikeln auf Schmelzproben im Oberkiefer- Molarenbereich aus Habilitationsschrift M. Hannig 1999

Zeit (min)	Pellikeldicke (nm)	
	bukkal	palatinal
1	10 bis 20	10 bis 20
120	250 bis 500	20 bis 100
360	500 bis 1000	200

In Anbetracht des schnellen Dickenwachstums der Pellikel innerhalb von 30 bis 90 Minuten scheint es eine sinnvolle Schlussfolgerung zu sein, dass die Pellikelbildung

eher auf der Adsorption von Proteinaggregaten als auf der Adsorption einzelner Proteine beruht.

Die meisten Proteine des Parotisspeichels liegen als kugelförmig strukturierte Agglomerate mit einem Durchmesser von 100 bis 200 nm vor. Es wird vermutet, dass diese Globuli einen hydrophoben Kern und eine negativ geladene Oberfläche besitzen. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu Kasein-Mizellen in der Milch wurden sie als mizellähnliche Strukturen bezeichnet (Rølla und Rykke 1994, Rykke et al. 1995). Mizellen stellen makromolekulare Strukturen im Speichel dar (Soares et al. 2004). Das Aminosäureprofil der Mizellen-Globuli ist dem der *in vivo* gebildeten 2h-Pellikel auffallend ähnlich (Young et al. 1999), was darauf hindeutet, dass die Mizellen-Globuli einen Hauptbestandteil der neu gebildeten Pellikel darstellen und zur Ausbildung der globulären Pellikelschichten beitragen könnten. Soares et al. (2004) fanden heraus, dass sich das elektrophoretische Bandenmuster von Vollspeichel und Mizellen ähnelten, aber die Bandenintensität sehr verschieden war. Aminosäureanalysen bestätigten, dass die Aminosäurezusammensetzung von Mizellen sich von der des Vollspeichels unterschied. Mizellen enthalten Proteine mit hohem (MG-2, IgA), mittlerem (Laktoferrin, Amylase, PRP) und niedrigem (Lysozym) Molekulargewicht. Es konnten viele heterotype Proteinkomplexe bestehend aus Muzin, Amylase, IgA, Lysozym, prolinreichen Proteinen und Statherin identifiziert werden, die sich entweder vor oder nach ihrer Adsorption an das Hydroxylapatit bilden (Iontcheva et al. 1997, Yao et al. 1999).

Diese Komplexe bewirken eine nicht-kovalente Bindung von Amylase, PRP's (prolinreiche Proteine), Histatin, Statherin, Cystatin und Lysozym zu MG 1 (Iontcheva et al. 1997). Dies legt wiederum die Vermutung nahe, dass die Pellikel eher durch Adsorption heterotyper Komplexe (Proteinagglomerate) bzw. mizellartiger Strukturen als durch die Adsorption einzelner Proteine gebildet werden könnte. Die Transglutaminase, ein Enzym, das durch bukkale Epithelzellen freigesetzt wird, scheint eine bedeutende Rolle bei der Bildung solcher Komplexe zu spielen (Iontcheva et al. 1997, Yao et al. 1999 und 2000, Hannig C et al. 2008). Diese heterotypen Komplexe dienen evtl. als Reservoir für Pellikelvorläuferproteine und schützen Speichelproteine möglicherweise vor der Proteolyse durch Speichelproteasen (Soares et al. 2004, Vitkov et al. 2004). Die physiologische Anflutung dieser supramolekularen Präkursoren ermöglicht eine schnelle Pellikelbildung, was durch die globulären Strukturen im

rasterelektronenmikroskopischen Bild von Pellikeloberflächen belegt wird (Deimling et al. 2004, Hannig M et al. 2001). Ebenso scheinen diese Komplexe eine Konzentration von Proteinen an den Grenzflächen zu bewirken. Micellen-Globuli und heterotypische Komplexe können als „supramolekulare Pellikelpräkursoren“ bezeichnet werden (Vitkov et al. 2004). Micellen spielen eine wichtige Rolle bei der Homöostase der Mundhöhle (Soares et al. 2004).

Die Pellikelschicht, die sich *in situ* innerhalb eines Zeitraumes von 30 bis 120 Minuten bildet (Abb. 1 und 2), weist eine netzwerkartige, globuläre Oberflächenbeschaffenheit auf, wobei die Durchmesser der globulären Strukturen zwischen 80 und 200 nm schwanken (Hannig M et al. 2001, Deimling et al. 2004). Auch diese Beobachtungen zeigen, dass die *In-vivo*-Pellikelbildung hauptsächlich durch die Adhäsion von Proteinaggregaten und weniger durch die Adsorption einzelner Speichelbiopolymere zustande kommt.

Unter *In-vivo*-Bedingungen ist die Schmelzoberfläche ständig dem Vollspeichel und dessen proteolytischer Wirkung ausgesetzt. Heterotype Komplexe (Iontcheva et al. 1997), enzymatische Biovernetzung (Yao et al. 1999 und 2000) oder Proteolyse (Hannig C et al. 2005) können die Eigenschaften der Speichelproteine verändern und zu einzigartigen molekularen Strukturen führen, die zur Pellikelbildung beitragen. Folglich ist die Pellikelbildung ein dynamischer Prozess (Vacca Smith und Bowen 2000), der durch kontinuierliche Adsorptions- und Desorptionsprozesse, durch enzymatische Veränderung der adsorbierten Moleküle, und durch intermolekulare Komplexbildung mit anderen Makromolekülen beeinflusst wird. Es mangelt jedoch gegenwärtig an Daten bezüglich der dynamischen Prozesse der *In-vivo*-Pellikel. Ebenso ungeklärt ist, welches die limitierenden Faktoren während der Pellikelreifung sind und welche Parameter das Gleichgewicht zwischen Adsorption und Desorption *in vivo* bestimmen.

### **2.4 Pellikelbildung in Abhängigkeit zur intraoralen Lokalisation**

Entgegen der früheren Meinung, dass die Pellikel auf allen Zahnoberflächen in der Mundhöhle eine gleichartige Stärke und Zusammensetzung aufweise, konnten in neueren Studien lokalisationsabhängige Unterschiede der Pellikelbildung nachgewiesen werden (Carlén et al. 1998, Carlén et al. 2003, Hannig M 1997, Hannig M 1999). Anhand dieser Studien kann man vermuten, dass sich die

Pellikelbildung auf der Schmelzoberfläche in verschiedenen Lokalisationen der Mundhöhle entsprechend den topisch vorherrschenden Milieubedingungen vollzieht und durch lokal disponierende Faktoren wie die regional unterschiedlichen Speichelzusammensetzung, Speichelfließrate und durch die jeweiligen Scherkräfte und Abnutzungen bestimmt wird.

Studien aus den 70er Jahren zeigten, dass es bzgl. der verschiedenen Mundhöhlenlokalisationen keine systematischen Unterschiede im Hinblick auf den Grundaufbau der Pellikel gibt. Das Aminosäureprofil der von den Bukkalflächen oberer Molaren, oberer und unterer Inzisivi gewonnenen Pellikel ist praktisch identisch (Sønju und Rølla 1973). Aminosäureanalysen zeigten auch, dass die Pellikelzusammensetzung nicht nur intraindividuell, sondern auch interindividuell identisch ist (Rykke et al. 1990, Rykke und Sønju 1991). Weiterhin wurde eine beträchtliche interindividuelle Übereinstimmung des Aufbaus der *in vivo* gebildeten Pellikel beschrieben (Rykke et al. 1990, Yao et al. 2001, Al-Hashimi und Levine 1989, Sønju et al. 1997).

Mittels Elektrophorese und Immunoblotting konnten Carlén et al. (1998) jedoch zeigen, dass das Gesamtproteinmuster der Pellikel aus verschiedenen Regionen der Mundhöhle typisch ist für den Speicheltyp, der während der Pellikelbildung an diesen Orten vorherrscht. Diese Entdeckung zeigt deutlich, dass, wie eingangs bereits erwähnt, die an der jeweiligen Lokalisation vorhandenen Speichelbiopolymere für Bildung und Aufbau der Pellikel von Bedeutung sind.

Die großen Speicheldrüsen zeigen charakteristische Unterschiede innerhalb der Zusammensetzung, der Sekretionsrate und der biologischen Aktivität einzelner Speichelkomponenten (Veerman et al. 1996). Die Speichelsekretion aus den unterschiedlichen Drüsen erfolgt nicht regelmäßig (Dawes et al. 1963, MacPherson 1991, Sas und Dawes 1997). Auch daraus kann gefolgert werden, dass ein lokalisationsabhängiges Angebot an Speichelbiopolymeren für die Pellikelbildung zur Verfügung steht (Hannig M 1997, Carlén et al. 1998, Hannig M 1999 b). Hierbei darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass sich die Speichelsekrete der einzelnen Drüsen in der Mundhöhle vermischen, und sowohl die Pellikelbildung als auch die Pellikelreifung ein dynamischer Prozess sind. Letzteres stellt wohl das Bindeglied zu den Studien von Sønju und Rølla (1973), Sønju et al. (1986), Rykke et

al. (1990) und Rykke und Sønju (1991) dar, die keine lokalisationsabhängigen Unterschiede der Aminosäurezusammensetzung der Pellikel feststellen konnten.

TEM-Studien zur Ultrastruktur der Pellikel (Hannig M 1998) zeigten deutliche Unterschiede der Pellikelmorphologie in Abhängigkeit von der introralen Lokalisation. Die 2-Stunden-Pellikel der Labialfläche oberer Schneidezähne stellt sich als 10 bis 20 nm dicke, elektronendichte Basalschicht mit feinglobulären Auflagerungen bis zu einer Stärke von 100 nm dar. Auf den Lingualflächen unterer Schneidezähne bildet sich eine elektronendichte Basalschicht und eine bedeckende globuläre Schicht von 30 bis 60 nm Gesamtdicke. Auf den Bukkalflächen unterer Molaren bildet sich eine bis zu 200 nm dicke Pellikel, bestehend aus einer elektronendichten Basalschicht und einer variabel globulär formierten Schicht. Auf der Lingualfläche unterer Molaren zeigt sich eine homogen strukturierte globuläre Schicht mit stark variierender Dicke von 50 bis 250 nm. Auf Lingualflächen bildet sich nach 2 Stunden im Schnitt eine 20 bis 80 nm dicke, homogene, vorwiegend granuläre Pellikel aus. Bukkalflächen weisen eine 200 bis 700 nm dicke, dichte und globulär strukturierte Pellikel auf (Hannig M 1999).

### **2.5 Pellikelbildung und bakterielle Adhärenz**

Die Mundhöhle wird hauptsächlich von Mikroorganismen kolonisiert, die ausschließlich im Mund vorkommen (Whittaker et al. 1996). Sie stellt ein natürliches Biotop dar, in dem zahlreiche Arten von Mikroorganismen koexistieren und ökologische Nischen besiedeln. Die Fähigkeit, an Festkörper- und Schmelzoberflächen zu adhären, ist von entscheidender Bedeutung für die bakterielle Akkumulation und Proliferation und letztendlich damit auch für die Pathogenität des bakteriellen Zahnbelages (van Houte et al. 1970, 1971, Gibbons und Van Houte 1975).

Die ersten Bakterien erscheinen auf einer frisch gesäuberten Zahnoberfläche innerhalb von Minuten (Saxton 1973), und scheinen dabei Oberflächenunregelmäßigkeiten zu bevorzugen (Finke et al. 2002, Lie 1977).

Zu den Erstbesiedlern zählen verschiedene Streptokokken: 80% der Streptokokken bestehen aus *Streptococcus oralis*, *S. sanguis* und in geringerem Maße auch *S. mitis* (Van Houte et al. 1970, Rönström et al. 1977, Socransky et al. 1977, Theilade et al.

1982, Liljemark et al. 1986, Cassels et al. 1995). Zu den Erstbesiedlern zählen auch grampositive Stäbchen (Socransky et al. 1977, Nyvad und Kilian 1987). Actinomyzeten wie *A. viscosus* und *A. naeslundii* gehören zu den am häufigsten vorkommenden Stäbchen der Initialplaque (Rönström et al. 1977, Socransky et al. 1977, Theilade et al. 1982, Liljemark et al. 1986, Nyvad und Kilian 1987). Die Ergebnisse aus Studien von Gibbons et al. (1986), Gibbons und Hay (1989), Hulbert und Gibbons (1990) deuten darauf hin, dass durch die Präadsorption von prolinreichen Proteinen oder hochmolekularen Muzinen aus dem submandibulären Speichel die Adsorption von Mutans-Streptokokken auf Hydroxylapatit begünstigt wird. Vor allem saure prolinreiche Proteine scheinen fördernd für die bakterielle Adhäsion an der Schmelzoberfläche zu sein (Gibbons und Hay 1988 a, b, Gibbons 1989). Die sauren prolinreichen Proteine können erst nach der Adsorption an der Schmelzoberfläche als Bindungsrezeptoren für Mikroorganismen dienen, da die molekularen Bindungsstellen für die bakterielle Adhärenz verdeckt sind, solange sie noch frei im Speichel gelöst vorliegen. Erst nach Adsorption (Immobilisation in der Pellikel) erfolgen Konformationsänderungen oder enzymatische Umwandlungen, die dann die Bindungsstellen (Gibbons 1989) für Bakterien freilegen (Gibbons und Hay 1988 a, b).

Kryptitope, werden jedoch durch ähnliche Moleküle in der Lösung imitiert und entgehen so der Immunabwehr. Daraus folgt, dass Adhäsine, die Kryptitope in oberflächenassoziierten Molekülen erkennen können, zweifelsfrei einen großen Selektionsvorteil für einen die Zahnoberfläche besiedelnden Organismus darstellen. So haben Studien zum Beispiel gezeigt, dass an Hydroxylapatit adsorbierte saure prolinreiche Proteine (PRP`s) die feste Adhäsion von *Actinomyces viscosus* auf der Oberfläche fördern, während gelöste PRP`s *A. viscosus* nicht fest binden (Gibbons und Hay 1988).

Aus dem Speichel sind unterschiedliche Proteinkomponenten isoliert worden, die an der Oberfläche von Streptokokken anbinden können. Diese Proteine sind auch als Bestandteile der Pellikel identifiziert worden, was den Schluss zulässt, dass diese als hochspezifische Rezeptormoleküle für die bakterielle Adhärenz an der Zahnoberfläche dienen (Gibbons und Spinell 1970, Van Houte et al. 1970, Hay et al. 1971, Kashket und Donaldson 1972, Gibbons und Van Houte 1975, Clark und Gibbons 1977, Gibbons und Queshi 1978, Appelbaum et al. 1979, Hogg und Embery

1979, Van Houte 1980, Stinson et al. 1982, Embery et al. 1984, Ellen 1985, Gibbons und Hay 1988 a, b, Gibbons 1989, Kishimoto et al. 1989, 1990).

Mit der Zeit wird die Adhäsion einiger der o. g. Erstbesiedler irreversibel, sodass durch ihre Proliferation „sesshafte“ Kolonien entstehen. Die Co-Aggregation ermöglicht es neu ankommenden Spezies, die Oberfläche der schon zuvor dort existierenden Bakterien-schicht zu kolonisieren. Durch das Wachstum der Bakterien-schicht werden die ursprünglich überwiegend kokkoiden grampositiven Mikroorganismen durch fadenförmige Bakterien ersetzt, und damit wird ein ökologischer Lebensraum geschaffen, der für die Ansiedlung von überwiegend gramnegativen, anaeroben Mikroorganismen geeignet ist (Listgarten 1999).

Im Allgemeinen werden Mikroorganismen durch die Kraft des Speichelflusses passiv an die Zahnoberfläche transportiert (Marsh und Bradshaw 1995). Wenn sich eine Zelle dem pellicelbedeckten Schmelz annähert, üben weitreichende physikalisch-chemische Kräfte eine schwache unspezifische Anziehung aus. Dies geschieht etwa 10 bis 20 nm von der Oberfläche entfernt, und wird durch die hohe Ionenstärke des Speichels verstärkt. Diese Wechselwirkung ist relativ schwach und die Phase der Adhäsion ist reversibel (Marsh und Bradshaw 1995). Die Bindungsstärke kann sich erhöhen, je näher die Zelle der Oberfläche kommt, so dass spezifische, über kurze Strecken wirkende, stereo-chemische Interaktionen wirken können. In Laborversuchen konnte eine Vielzahl von spezifischen molekularen Interaktionen nachgewiesen werden, die an den Adhäsionsvorgängen an der Zahnoberfläche beteiligt sein können. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Adhäsion der Erstbesiedler an der Zahnoberfläche durch eine Vielzahl von Strukturen determiniert wird, einschließlich der Pili, Fibrillen und Fimbrien. Die molekularen Bestandteile dieser für die Adhäsion verantwortlichen Strukturen werden den Adhäsinen zugeordnet (Marsh und Martin 1999) und schließen Kohlenhydratschichten, Lipoteichonsäure, Kohlenhydrat-bindende-Proteine oder Lectine mit ein. Diese interagieren mit einer Vielzahl von Rezeptoren auf der Zahnoberfläche, von denen viele Derivate von Speichelbestandteilen sind (Liljemark und Bloomquist 1996, Jenkinson und Lamont 1997). Sie können ebenso mit Rezeptoren anderer Bakterien, Glykolipiden oder extrazellulären Proteinen wie Kollagen und Fibrinogen interagieren (Cassels et al. 1995, Scannapieco 1994). Die Rezeptoren für orale Mikroorganismen in der Pellicel sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

## 2. Einleitung

Tab. 2: Orale Mikroorganismen und ihre Bindungsstellen in der Pellikel mit zugehöriger Literaturquelle

Bakterium	Bindungsstelle	Bezugsquelle
<b>Streptococcus mutans</b>	Glucan	Schilling und Bowen 1992
	saure PRP's	Gibbons und Hay 1989
	Hochmolekulare Muzine	Gibbons et al. 1986
<b>Streptococcus sanguis</b>	Komplex aus sIgA leichte Kette und $\alpha$ -Amylase	Gong et al. 1998 Gong et al. 2000
	$\alpha$ -Amylase	Douglas 1983, Scannapieco et al. 1989, Murray et al. 1992
	Fibrinogen	Lee et al. 2001
	Lysozym	Tellefson und Germaine 1986
	Speichelmuzin (MG2)	Stinson et al. 1982, Takahashi et al. 2002, Gibbons et al. 1991
<b>Streptococcus gordonii</b>	saure PRP's	Gibbons et al. 1991
	$\alpha$ -Amylase	Murray et al. 1992, Gibbons et al. 1991, Douglas 1990, Scannapieco et al. 1995
	Fibrinogen	Lee et al. 2001
	Speichelmuzin (MG2)	Takahashi et al. 2002
	Glucan	Hiroi et al. 1992
<b>Streptococcus pyogenes</b>	Glucan	McCabe 1977
<b>Streptococcus mitis</b>	Fibrinogen	Lee et al. 2001
	$\alpha$ -Amylase	Rosan und Lamont 2000
	Glucan	McCabe 1977
<b>Streptococcus oralis</b>	Fibrinogen	Lee et al. 2001
	Speichelmuzin (MG2)	Takahashi et al. 2002
	$\alpha$ -Amylase	Murray et al. 1992
<b>Streptococcus sobrinus</b>	Glucan	Gibbons et al. 1988
<b>Actinomyces naeslundii</b>	saure PRP's	Gibbons und Hay 1988
	Fibrinogen, Fibronectin, IgG, IgA	Carlén et al. 2003
<b>Actinomyces viscosus</b>	Speichel-PRP's	Iontcheva et al. 1997
	PRP'S, Statherin	Gibbons et al. 1988, Gibbons und Hay 1988
<b>Veillonella parvula</b>	Glucane der Glycosyltransferase	McCabe 1977
<b>Fusobacterium nucleatum</b>	Fibrinogen, Fibronectin, IgG, IgA	Carlén et al. 2003
<b>Porphyromonas gingivalis</b>	Fibrinogen, Fibronectin, IgG, IgA	Carlén et al. 2003

### 2.6 Ultrastruktur der Pellikel

Das bisher vorhandene Wissen über das mikromorphologische Erscheinungsbild der Pellikel basiert hauptsächlich auf (konventionellen) transmissions- und rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen (Leach et al. 1967, Hannig M 1999, Hannig M 1997, Hannig M und Bößmann 1989 a, b, Meckel 1965, Tinanoff et al. 1976, Armstrong 1968, Nyvad et al. 1984, Lie 1977, Leach 1966).

Bislang sind nur sehr wenige Ergebnisse zur Pellikelultrastruktur publiziert worden, die auf der Nutzung neuerer Techniken wie Kryo-Elektronenmikroskopie (Schüppach

et al. 1996, Schüppach et al. 2001), konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM) (Amaechi et al. 1999), oder Rasterkraft-Mikroskopie (Hannig M et al. 2004, Deimling et al. 2004, Finke et al. 2002) basieren.

Basierend auf transmissionselektronenmikroskopischen (TEM) Studien wurde die *in vivo* gebildete und gereifte Pellikel als homogene, strukturlose, amorphe und bakterienfreie Membran mit unterschiedlicher Schichtstärke beschrieben (Meckel 1965, Tinanoff et al. 1976, Armstrong 1968, Leach und Saxton 1966). Im Vergleich zu den Approximalflächen wurde auf den Lingual- und Labialflächen eine weniger ausgeprägte Pellikel gefunden (Meckel 1965, Tinanoff et al. 1976, Leach und Saxton 1966). In Zonen, die der Selbstreinigung gut zugänglich sind, wie z.B. auf vestibulären oder oralen Glattflächen der Zähne, finden sich oftmals nur sehr dünne Pellikelschichten mit Stärken von 30 bis 80 nm (Leach und Saxton 1966, Lenz 1967, Tinanoff et al. 1976 b, c), während die Pellikeldicke approximal bis zu 2 µm betragen kann (Frank und Brendel 1966, Tinanoff et al. 1976 b, c). Auf den Bukkalflächen der Zähne entsteht nach 2 Stunden eine 100 nm starke, gleichmäßige Pellikel, deren Stärke sich im Laufe von 48 Stunden auf ca. 500 nm erhöht (Sønju et al. 1974, Lie 1975, 1977 b, Berthold 1979).

Systematischere transmissions- und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der *In-vivo*-Pellikelbildung zu verschiedenen Zeitabschnitten zeigten ein komplexeres ultrastrukturelles Muster der adsorbierten Pellikelschicht (Lie 1977, Berthold 1979, Nyvad und Fejerskov 1987, Nyvad und Fejerskov 1987). Die „junge“ 2-Stunden-Pellikel wurde durch elektronenmikroskopische Studien als 100 bis 500 nm dicke, unregelmäßige und unvollständige organische Beschichtung des Zahnschmelzes identifiziert (Sønju et al. 1974, Hannig M et al. 2004, Lie 1977, Berthold 1979). Nach einer Entwicklungsperiode von einigen Stunden oder Tagen weist die Pellikel eine kompaktere Schichtung mit granulärer ultrastruktureller Erscheinung auf (Tinanoff et al. 1976, Berthold 1979, Nyvad und Fejerskov 1987).

Die meisten dieser ultrastrukturellen Untersuchungen wurden anhand von im bukkalen Sulcus bzw. auf den Bukkalflächen der Zähne montierten Schmelzplättchen durchgeführt. Innerhalb der Mundhöhle lassen sich, bedingt durch die unterschiedlichen Speichelzusammensetzungen des von den verschiedenen Drüsen sezernierten Speichels, eine Reihe von unterschiedlichen Flüssigkeitsbedingungen finden (Sas und Dawes 1997). Die Sekretionen der verschiedenen Speicheldrüsen unterscheiden sich deutlich, insbesondere auch im Hinblick auf die

## 2. Einleitung

---

Proteinzusammensetzung (Veerman et al. 1996). Infolgedessen konzentrieren sich die neueren elektronenmikroskopischen und CLSM-Studien auf die lokalisationsabhängigen Unterschiede der Morphogenese der *In-vivo*-Pellikel (Hannig M 1999, Amaechi et al. 1999).

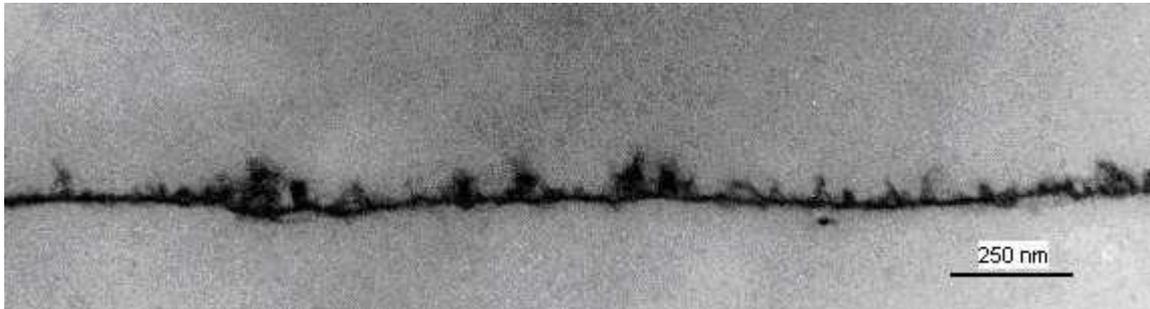


Abb. 1: TEM-Bild einer **30-Minuten-Pellikel** aus dem Oberkiefer Seitenzahngebiet (**bukkal**) Proband 1

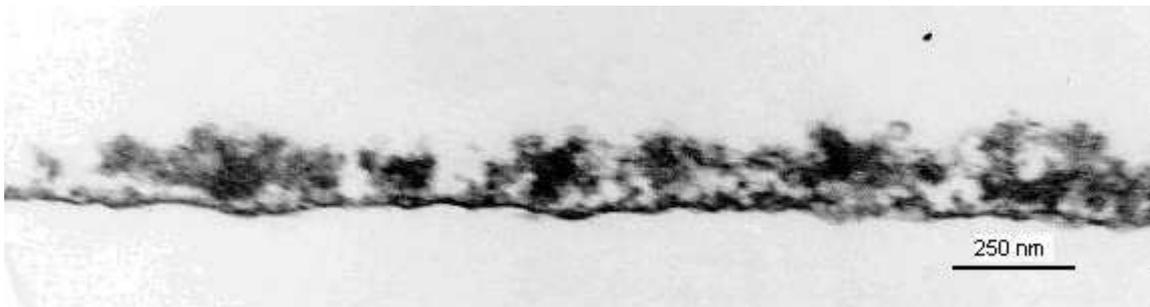


Abb. 2: TEM-Bild einer **120-Minuten-Pellikel** aus dem Oberkiefer Seitenzahngebiet (**bukkal**) Proband 1

Die 1-Minuten-Pellikel ist im TEM als eine gleichmäßige, homogen strukturierte, feingranulierte elektronendichte Schicht mit einer Dicke von 10 bis 20 nm identifiziert worden (Hannig M 1999). Die anschließende Adsorption der Speichelbiopolymere wird durch lokale Einflüsse der Mundhöhle gesteuert und ist überwiegend abhängig von der intraoralen Lokalisation (Hannig M 1999, Amaechi et al. 1999). Die bukkale 2-Stunden-Pellikel (Abb. 2) besteht aus einer dünnen elektronendichten Schicht und einer äußeren locker formierten Schicht aus granulären und globulären Bestandteilen mit variierender Schichtdicke von 100 bis 500 nm (Hannig M 1999). Im Gegensatz dazu zeigte sich die palatinale 2-Stunden-Pellikel als eine nur 20 bis 80 nm dicke, überwiegend granulär strukturierte Schicht (Hannig M 1999). Innerhalb von 24 Stunden wächst die palatinale Schichtdicke auf 100 bis 200 nm und die Dicke der bukkalen Pellikel dagegen auf 1000 bis 1300 nm (Hannig M (1999)). Die 24-Stunden-Pellikel ist durch eine elektronendichte Basalschicht auf der Schmelzoberfläche und eine ihr aufgelagerte dichte, homogene, granulär strukturierte Schicht

gekennzeichnet. Diese zeitabhängigen mikromorphologischen Veränderungen können als Reifungsprozess der Pellikel angesehen werden, d.h. als Änderungen der Zusammensetzung und Konformation der adsorbierten Proteinschicht.

Amaechi et al. analysierten 1999 mit Hilfe der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM) die Stärke der Pellikelschicht, die sich *in situ* innerhalb 1 Stunde auf Zahnschmelzproben an 8 verschiedenen intraoralen Lokalisationen bildet. Nach der *In-situ*-Pellikelbildung wurden die Schmelzplättchen mit einem kombinierten Antihuman Immunglobulin GAM behandelt, welches zur besseren mikroskopischen Visualisierung der Pellikel mit Fluoreszinoisothiocyanat konjugiert wurde. Die CLSM Ergebnisse zeigten deutlich, dass die Pellikeldicke je nach Lokalisation deutlich variierte. Die durchschnittliche Dicke reichte von 0,3 µm an den Palatinalflächen der oberen Schneidezähne bis zu 1,06 µm an den Lingualflächen der unteren Molaren. Die dickste Pellikel wurde an den unteren hinteren lingualen Oberflächen gebildet. Diese Flächen sind permanent dem Submandibular- und SublingualdrüsenSpeichel ausgesetzt. Dementsprechend wurde die dünnste Pellikel an den Palatinalflächen der oberen Schneidezähne gebildet. Diese Flächen werden weniger mit Speichel benetzt als die vestibulären, und sie sind der Abrasion durch die keratinisierten Anteile der Zunge ausgesetzt (Amaechi et al. 1999).

Diese Entdeckungen sind Beweise für die lokalisationsabhängig unterschiedliche Morphogenese der *in vivo* gebildeten Pellikel. Es wird angenommen, dass lokal wirksame Faktoren in der Mundhöhle wie z.B. Scherkräfte und die unterschiedliche Verfügbarkeit von Speichelbiopolymeren den Prozess der Pellikelbildung beeinflussen (Hannig M 1999, Amaechi et al. 1999, Hannig M 1997, Carlén et al. 1998). Locker strukturierte globuläre Pellikelschichten, wie sie für bukkale Zahnflächen typisch sind, sind im palatinalen Bereich weniger widerstandsfähig gegenüber den Scherkräften durch die Zungenbewegungen und können somit auf Palatinalflächen oberer hinterer Zähne nicht gefunden werden. Um den Einfluss der Scherkräfte zu untersuchen wurden Schmelzplättchen mit kleinen, 1 mm tiefen und 0,3 mm breiten Rillen versehen, und auf den Bukkal- und Palatinalflächen der oberen ersten Molaren getragen (Sønju Clasen et al. 2000). Die TEM-Analyse konnte keine Unterschiede in der Ultrastruktur und der Dicke der 2-Stunden-Pellikel an der Oberfläche und in den Rillen aufdecken (Sønju Clasen et al. 2000). Weder auf der Oberfläche noch in den Rillen der palatinal getragenen Proben konnte eine äußere globulär strukturierte Schicht ermittelt werden. Diese Beobachtungen zeigen, dass

die Scherkräfte der Zunge keinen direkten Einfluss auf die Dicke und die Ultrastruktur der adsorbierten Pellikelschicht haben.

Im Allgemeinen zeigen TEM-Untersuchungen (Hannig M 1999, Hannig M 1997, Berthold 1979), dass die Pellikel aus einer fest adsorbierten elektronendichten Basalschicht besteht, der eine locker formierte äußere Schicht aufgelagert ist. Diese ultrastrukturellen Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen über Unterschiede bezüglich der Desorption der adsorbierten Proteine durch Pufferspülung und Elution mit verschiedenen oberflächenaktiven Stoffen überein (Vassaliakos et al. 1982, 1993). Die Resultate dieser Studien zeigen, dass die Pellikel aus Fraktionen von lose und fest gebundenen Proteinen besteht, die an der Oberfläche mit unterschiedlicher Bindungskraft haften (Vassaliakos et al. 1982, 1993, Arnebrandt und Simonsson 1991).

Basierend auf konventionellen rasterelektronenmikroskopischen Analysen von fixierten und dehydrierten Pellikelproben ist ein unregelmäßiges „knotiges“ morphologisches Muster der Pellikeloberfläche beschrieben worden (Nyvad und Fejerskov 1987, Busscher et al. 1989). Neuere hochauflösende Untersuchungen mittels Rasterelektronenmikroskop und Rasterkraft-Mikroskop zeigen, dass die Oberfläche der *in vivo* gebildeten Pellikel aus einem schwammartigen Netzwerk von sphärischen Partikeln besteht (Hannig M et al. 2004, Hannig M et al. 2001, Deimling et al. 2004, Schüpbach et al. 2001, Hannig M 2002).

Die Durchmesser dieser Partikel lagen je nach Dauer der Pellikelbildung zwischen 10 und 20 nm innerhalb der ersten Minuten (Hannig M et al. 2004), und 20 bis 60 nm nach 30 min bis 2 Stunden. In der 2-Stunden-Pellikel konnten sogar noch größere Aggregate von adsorbierten Proteinen mit Durchmessern von 100 nm ermittelt werden (Hannig M et al. 2001).

Die adsorbierte Pellikelschicht besteht vermutlich aus einer zufälligen Anordnung diverser Speichelbiopolymere, die zeitabhängig bestimmten Änderungen unterworfen sind. Die variable Ultrastruktur der (äußeren) Pellikelschicht reflektiert die komplexen Prozesse von Absorption und Desorption, die zur Pellikelbildung beitragen. Es ist daher nicht möglich die Bildungsrate oder die abschließende Schichtstärke der Pellikel genau zu bestimmen. Dennoch kann aus vorangegangenen Studien geschlossen werden, dass die Schichtstärke der Pellikel ca. 1 Stunde lang zunimmt, und danach 1 bis 2 Stunden auf konstantem Niveau bleibt (Skjørlund et al. 1995, Kuboki et al. 1987).

### **2.7 Funktion und Bedeutung der Pellikel**

Die Pellikel stellt einen dynamischen Biofilm dar. Sie ist von großer physiologischer und pathophysiologischer Bedeutung für alle Interaktionen an der Grenzfläche zwischen Zahn und Speichel (Lendenmann 2000, Hannig M 2002). Die Pellikel besitzt aufgrund ihrer Proteinschutzschicht anti-erosive Eigenschaften (Hannig M und Balz 2001, Hannig M et al. 2004, Hannig C et al. 2007) und ist an allen Interaktionen an der Phasengrenze flüssig / fest in der Mundhöhle, wie z.B. an der De- und Remineralisation, an der „Schmierung“ der Zahnoberfläche sowie bei der bakteriellen Adhäsion beteiligt

#### **2.7.1 „Lubrikant“ an der Zahnoberfläche**

Die Pellikel dient als „Lubrikant“. Dadurch wird die Friktion antagonistischer Zahngruppen bei Abrasions- und Attritionsprozessen sowie beim Kauen und Sprechen erniedrigt (Joiner et al. 2008). Speisen und Weichgewebe gleiten besser über die Zahnoberflächen (Aguirre et al. 1989, Tabak et al. 1982, Mayhall 1980, Nikiforuk 1985). Durch saure Noxen wie Zitronensäure oder säurehaltige Erfrischungsgetränke kann die Pellikel kurzzeitig verloren gehen, es imponiert der Eindruck „stumpfer“ Zähne (Mayhall 1980). Der Schmiereffekt ist auf die in der Pellikel adsorbierten Muzine Glykoprotein I und II sowie Statherin zurückzuführen (Douglas et al. 1991, Ramasubbu et al. 1993, Tabak 1995). Hochmolekulares Muzin (MG1) erhöht die rheologischen Eigenschaften an der Zahnoberfläche. In einer neueren Studie (Berg et al. 2003) wurden mittels der Rasterkraft-Mikroskopie die zwischen adsorbierten Speichelfilmen herrschenden Kräfte gemessen. Man fand heraus, dass die Existenz von Pellikelschichten den Friktionskoeffizienten zwischen Festkörperoberflächen um den Faktor 20 verringert. Diese Reduktion der Friktion entspricht den im weitesten Sinne normalen Abstoßungskräften, die zwischen Speichelfilmen herrschen. Somit basiert der Schmiereffekt auf einer vollständigen Separierung der Gleitflächen durch die Speichelfilme.

Es wurde außerdem vermutet, dass die Zahnoberfläche durch die Pellikel vor übermäßiger Abrasion und Attrition geschützt wird (Mayhall 1980, Nikiforuk 1985), jedoch mangelt es hierzu an systematischen Untersuchungen über den Effekt und den Einfluss der Pellikel auf die Zahnabnutzung (Joiner et al. 2008).

### 2.7.2 Semipermeable Membran

Die Pellikel fungiert als wichtige „Schutzmembran“ für die Schmelzoberfläche, indem sie die Demineralisation behindert und die Remineralisation fördert.

Hannig M et al. (2004) untersuchten den protektiven Effekt der Kurzzeitpellikel, welche über Zeiträume von 3 -, 60 - und 120 Minuten gebildet wurden, gegenüber dem demineralisierenden Einfluss der Zitronensäure. Die Pellikel stellte dabei auf allen untersuchten pellikelbedeckten gegenüber unbedeckten Schmelzoberflächen einen signifikanten Schutzfilm dar. Bereits die 3-Minuten-Pellikel bietet Schutz vor dem erosiven Einfluss der Zitronensäure.

Auch auf Dentinoberflächen stellt die Pellikel einen wirksamen Schutz vor Säureeinwirkung dar (Hannig C et al. 2007).

Die *in vitro* gebildete Pellikel weist eine selektive Permeabilität auf, die De- und Remineralisationsprozesse an der Schmelzoberfläche reguliert (Zaharadnik et al. 1976, 1997, 1978). Aufgrund ihrer selektiven Durchlässigkeit, die darin besteht, die Diffusion von sauren Noxen selbst und den Ionenfluss von Kalzium und Phosphat in und aus der Schmelzoberfläche zu verringern, spielt die Pellikel eine wichtige modifizierende Rolle bei der Demineralisation des Zahnschmelzes (Slomiany et al. 1986, Zaharadnik et al. 1976, 1997, 1978, Schüle 1961, 1962, 1963).

Der präzise Mechanismus, der die Diffusion von Ionen zwischen der Schmelzoberfläche und der umgebenden Mundhöhle in Anwesenheit der Pellikelschicht reguliert, ist bislang jedoch noch nicht vollständig geklärt.

Busscher et al. (2003) haben die Vermutung geäußert, dass die Pellikel eine offene Struktur sei, die den Ionenaustausch an der Schmelzoberfläche erlaube. Diese These wird durch hochauflösende SEM und AFM – Bilder untermauert, die eine schwammartig poröse Struktur der Pellikel zeigen (Hannig M et al. 2001, Schüpbach et al. 2001, Deimling et al. 2004, Hannig M 2002). Die Pellikel stellt somit ein Medium dar, durch das Fluoride, Kalzium und Phosphat während der Rekalzifikaktion zur Verfügung gestellt werden. Gleichzeitig weist sie eine gewisse Schutzfunktion gegen die säurebedingte Demineralisation und die Attrition auf (Zaharadnik et al. 1976, Meurman und Frank 1991, Hannig C et al. 2007, Hannig M et al. 2004, Joiner et al. 2008). Die *in situ* gebildete Pellikel reduziert und verzögert die Schmelzdemineralisation während des Säureangriffs, sie kann die säurebedingten

Veränderungen der Schmelzoberfläche aber nicht komplett verhindern (Hannig M et al. 2004 a und 2004 b, Hannig M und Balz B 1999, Hannig M und Balz M 2001, Hannig M et al. 2003, Hannig C et al. 2009).

Es gibt nur eine begrenzte Anzahl von Daten im Bezug auf das Verhalten und die ultrastrukturellen Veränderungen der Pellikel unter dem Einfluss saurer Noxen (Finke et al. 2002, Hannig M und Balz, B 1999, Hannig M und Balz M 2001, Hannig M et al. 2003).

TEM – Analysen zeigen, dass sich die *in situ* gebildete Pellikel unter Säureeinfluss von ihren externen zu den basalen Komponenten hin auflöst (Hannig M 2002, Hannig M und Balz B 1999, Hannig M und Balz M 2001, Hannig M et al. 2003, Hannig C et al. 2009). Die weniger dichte, locker angeordnete äußere Pellikelschicht besitzt im Gegensatz zur dicht formierten Basalschicht, die eine höhere Säureresistenz aufweist, eine vergleichsweise hohe Löslichkeit in Zitronensäure. Selbst nachdem die Pellikel für 300 Sekunden einer 0,1%igen Zitronensäure ausgesetzt war, erscheint die elektronendichte Basalschicht noch als ein zusammenhängendes Band ohne Kontinuitätsunterbrechung auf der Schmelzoberfläche (Hannig M 2002, Hannig M und Balz B 1999, Hannig M und Balz M 2001). Die Tatsache, dass die Pellikel durch einen kurzfristigen Säureangriff nicht vollständig von der Schmelzoberfläche abgelöst werden kann, lässt eine partielle Säureresistenz der *In-vivo*-Pellikel vermuten. Dies wiederum bedeutet, dass die Pellikel bis zu einem gewissen Grad als Diffusionsbarriere und semipermeable Membran fungieren könnte (Hannig M 2002, Hannig M et al. 2003).

Pellikel weisen je nach ihrem Entstehungsort charakteristische lokalisationsabhängige Unterschiede hinsichtlich ihrer Zusammensetzung, ihrer Dicke und ihres ultrastrukturellen Aufbaus auf (Hannig M 1999, Amaechi et al. 1999, Carlén et al. 1998). Die Erosionsschutzwirkung hängt von der Stärke der Pellikel ab (Amaechi et al. 1999), und es konnte nachgewiesen werden, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen der Dicke der *in situ* gebildeten 1h - Pellikel und ihrer Schutzfunktion gegen Erosion gibt.

Nicht nur die Dicke der Pellikel und ihr ultrastruktureller Aufbau, sondern auch ihre Zusammensetzung könnten zu ihrer schützenden Funktion beitragen. Für die reduzierte Diffusion von Milchsäure sind vor allem die Lipidanteile der Pellikel,

insbesondere die Phospholipide verantwortlich (Slomiany et al. 1986, 1990, Murty et al. 1990). Phospholipide steigern durch Interaktionen mit Muzinen die Festigkeit der Pellikel (Slomiany und Murty 1986, Slomiany und Murty 1990). Die Entfernung der Lipide aus der Pellikel erhöht die Diffusionsrate von Milchsäure um 50% (Slomiany et al. 1986, 1990).

Es konnte nachgewiesen werden, dass Speichel – Carboanhydrase VI in der Pellikel unter Beibehaltung ihrer enzymatischen Aktivität adsorbiert wird (Leinonen et al. 1999). Carboanhydrase katalysiert die reversible Reaktion  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ . Daraus kann man ableiten, dass die im Speichel enthaltene und in der Pellikel immobilisierte Carboanhydrase die Neutralisation von Säure katalysiert und somit auch zum Schutz der Schmelzoberfläche vor Demineralisation beiträgt.

### 2.7.3 Die Bedeutung der Pellikelreifung für ihre schützenden Eigenschaften

Ausgehend von früheren *In-vitro*-Experimenten (Nikiforuk 1985, Zahradnik et al. 1997, Nieuw Amerongen et al. 1987) wurde angenommen, dass das schützende Potential der Pellikel mit zunehmender Bildungszeit ansteigt. Diese *In-vitro*-Studien zeigen, dass mehrtägige Reifeprozesse notwendig sind, damit die Pellikel ihre kompletten Funktionseigenschaften erhält (Zahradnik et al. 1976, Zahradnik et al. 1978, Nieuw Amerongen et al. 1987). In den letzten Jahren sind jedoch kontroverse Resultate bezüglich des Einflusses der Bildungszeit auf die schützenden Eigenschaften der Pellikel veröffentlicht worden. Obgleich man allgemein anhand der Ergebnisse der *In-vitro*-Studien annimmt, dass die Funktion der Pellikel als Diffusionsbarriere für den Ionenfluss auf der Schmelzoberfläche mit dem Prozess der Reifung zunehmend besser wird (Zahradnik et al. 1976, Zahradnik et al. 1978, Nieuw Amerongen et al. 1987, Kautsky et al. 1993, Featherstone et al. 1993), haben neuere *In-vivo*-Studien gezeigt, dass sogar kurzfristig *in situ* gebildete Pellikelschichten die Schmelzoberfläche wirkungsvoll schützen können (Amaechi et al. 1999, Hannig M et al. 2003, Hannig M et al. 2004). Es hat sich herausgestellt, dass Pellikelschichten, die *in situ* über Zeiträume von 2 -, 6 -, 12 - und 24 Stunden und sogar über 7 Tage gebildet wurden, keine großen Unterschiede hinsichtlich des Schutzes der Schmelzoberfläche gegen die Erosion durch Zitronensäure aufwiesen (Hannig M und Balz 1999, Hannig M und Balz 2001, Hannig M et al. 2003). Amaechi et al. (1999) fanden heraus, dass eine *in situ* gebildete 1h–Pellikel einen gewissen Schutz der

Schmelzoberfläche gegen die Erosion durch Orangensaft aufweist. Eine ebenfalls neuere Studie (Hannig M et al. 2004) zeigte, dass sogar eine 3min – Pellikel eine gewisse Schutzwirkung für die Schmelzoberfläche gegen Zitronensäure darstellt, die sich nicht signifikant von der einer 2h– Pellikel unterscheidet. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass sich das Schutzpotalential der *in vivo* gebildeten Pellikel offensichtlich nicht mit zunehmendem Reifeprozess erhöht. Folglich scheinen die angenommenen Prozesse der Pellikelreifung und – entwicklung weniger bedeutsam für die Schutzfunktion der Pellikel unter *In-vivo*-Bedingungen zu sein, als es frühere *In-vitro*-Studien vermuten ließen.

### 2.7.4 Mineralhomöostase

Zusätzlich moduliert die Pellikel den Prozess der Mineralpräzipitation an der Schmelzoberfläche. Der Speichel ist mit Kalzium- und Phosphationen übersättigt, die als Depot für die Remineralisation von demineralisiertem Zahnschmelz zur Verfügung stehen (Gibbons und Hay 1988a). Eine kontinuierliche, oberflächeninduzierte Präzipitation von Kalziumsalzen aus dem Speichel an der Zahnoberfläche würde zu einer ständigen Vergrößerung der Schmelzoberfläche aufgrund des Kristallwachstums von Hydroxylapatit führen (Zahradnik et al. 1979). Saure prolinreiche Glykoproteine besitzen eine hohe Affinität zu Hydroxylapatit und sind ein obligater Bestandteil der Pellikel (Kousvelari et al. 1980, Bennick et al. 1981 a, b, 1983). Sie wirken im adsorbierten Zustand als Inhibitoren einer oberflächeninduzierten Mineralablagerung (Hay et al. 1979, Moreno et al. 1979, Aoba et al. 1984, Schlesinger und Hay 1986, Madapallimattan und Bennick 1989) und verhindern so die kontinuierliche Ausfällung von Kalziumsalzen an der Schmelzoberfläche.

### 2.7.5 Modulation der bakteriellen Adhärenz

An der Grenzfläche zwischen Mundhöhle und Schmelzoberfläche wirkt die Pellikel auch selektiv auf die Adhärenz der Bakterien und ist in die Frühstadien der Bildung des mikrobiellen Biofilms involviert. Bestandteile der Pellikel dienen als Rezeptoren für die bakterielle Adhärenz. Eine enzymatische Veränderung der Pellikel kann die Funktionseigenschaften der Pellikeloberfläche beeinflussen und somit auch die bakterielle Adhäsion (siehe auch 2.5).

### 2.7.6 Antibakterielle Eigenschaften

In der Pellikel konnten Komponenten der spezifischen und der unspezifischen Immunabwehr nachgewiesen werden (Al-Hashimi und Levine 1989, Carlén et al. 1998, Hannig C et al. 2005, Kraus et al. 1973, Li et al. 2003, Li et al. 2004, Ørstavik und Kraus 1973, Ørstavik und Kraus 1974, Rüdiger et al. 2002, Yao et al. 2001).

Dazu zählen Agglutinine, Komplementfaktoren 3 / 3c, die Immunglobuline IgA, IgG und IgM, wovon das sekretorische IgA am bedeutendsten ist.

Lysozym ist das wichtigste antibakterielle Enzym in der Pellikel (Hannig C et al. 2005, Hannig C et al. 2005, Pruitt et al. 1969). Bereits die 1-Minuten-Pellikel zeigt eine hohe Lysozymaktivität (Hannig C et al. 2005, Hannig C et al. 2009, Pruitt et al. 1969), es zerstört die bakterielle Zellmembran und aktiviert bakterielle Autolysine (Laible und Germaine 1985). Viele Mikroorganismen der Mundhöhle sind gegenüber Lysozym resistent, in Anwesenheit des enzymatischen Co-Faktors Protease können aber auch diese hydrolysiert werden (Pollock et al. 1983, 1984, 1987).

Peroxidasen hydrolysieren Radikale und katalysieren die Reduktion von  $H_2O_2$  und Thiocyanat unter Bildung von Hypothiocyanat, wodurch das bakterielle Wachstum gehemmt wird (Hannig C et al. 2005, Hannig C et al. 2005, Mansson-Rahemtulla et al. 1988, Bjørck et al. 1975, Lenander-Lumikari et al. 1993, Steele und Morrison 1969).

Ebenso weisen die Pellikelbestandteile Laktoferrin, Histatin und Cystatin protektive Eigenschaften auf.

### 2.8 Biochemische Zusammensetzung der Pellikel

Studien zur Pellikelzusammensetzung werden durch die Tatsache erschwert, dass nur sehr begrenzte Mengen des Pellikelmateriale von der Oberfläche menschlicher Zähne *in vivo* gewonnen und für analytische Untersuchungen aufbereitet werden können. Berechnungen ergaben, dass die auf einer Labialfläche innerhalb von 2 Stunden *in vivo* gebildete Pellikel nur ca. 1 µg an Proteinen enthält (Yao et al. 2001). Aus diesem Grunde sind viele Arbeiten mit *In-vitro*-Modellen durchgeführt worden, welche die Bildung der Speichelpellikel imitieren. Man verwendet glanduläre Speichelsekrete oder Vollspeichel dazu, um auf Hydroxylapatit oder Zahnschmelz eine pellikelartige adsorbierte Proteinschicht zu bilden. Auch wenn durch die *In-vitro*-Modelle ein beträchtlicher Einblick in die Selektivität und die Affinitätseigenschaften der Speichelproteine während der Adsorption an Hydroxylapatit oder Zahnschmelz gewonnen werden konnte, musste man doch feststellen, dass die *in vitro* gebildeten Pellikelschichten den Aufbau der *in vivo* gebildeten Pellikel nicht vollständig widerspiegeln (Yao et al. 2001, Al-Hashimi und Levine 1989, Carlén et al. 1998, Jensen et al. 1992). Daher können Informationen über die Zusammensetzung der Pellikel letztlich nur gewonnen werden, indem dazu das *in vivo* gebildete Pellikematerial gesammelt wird (Li et al. 2003).

In den letzten Jahren wurden verbesserte kombiniert mechanisch-chemische Methoden zur Pellikelgewinnung eingeführt (Yao et al. 2001, Carlén et al. 1998). Dabei wird die Zahnoberfläche entweder mit einem in 0,5 M Natriumbikarbonat getränktem PVDF-Membranfilter (Yao et al. 2001) oder mittels einem mit 2%iger SDS-Lösung benetzten Schwämmchen (Carlén et al. 1998) abgewischt.

Mit diesen Techniken konnten neue Daten über den Aufbau und die Zusammensetzung der Pellikel gewonnen werden (Yao et al. 2003, Yao et al. 2001, Carlén et al. 1998, Carlén et al. 2003, Rüdiger et al. 2002).

Generell stehen für die Pellikelbildung neben den im Speichel sezernierten Proteinen und Glykoproteinen auch Plasmaproteine, Blutgruppenbestandteile, Enzyme, Proteine aus Epithelzellen und Bakterien sowie Nahrungsbestandteile zur Verfügung, aber der Adsorptionsprozess verläuft spezifisch und selektiv (Hannig M und Joiner 2006, Yao et al. 2003), so dass die Pellikelzusammensetzung nur eingeschränkt die

Zusammensetzung des Speichels widerspiegelt, wie es für Enzymaktivitäten oder auch für Lipide gezeigt werden konnte (Hannig C et al. 2005, Hannig C et al. 2006, Slomiany et al. 1986, Slomiany et al. 1990).

Als Hauptbestandteile der Pellikel wurden Proteine und Glykoproteine identifiziert (Kraus et al. 1973, Ørstavik und Kraus 1973, Sønju und Rølla 1973, Ørstavik und Kraus 1974, Kousvelari et al. 1980, Bennick et al. 1983, Rølla et al. 1983, Embery et al. 1986, Ruan und Di Paola et al. 1986, Scheie et al. 1987, Al-Hashimi und Levine 1989, Edgerton und Levine 1992, Carlén et al. 1998, Leinonen et al. 1999).

Über die Lipidzusammensetzung der Pellikel gibt es nur sehr wenige Informationen. Es wurden Phospholipide und Glycolipide (Slomiany et al. 1986, 1990, Kautsky und Featherstone 1993) sowie eine große Anzahl verschiedener Kohlenhydrate nachgewiesen (Hay 1969, Mayhall 1970, Sønju et al. 1974, Mayhall und Butler 1976, Mayhall 1977).

### 2.8.1 Proteine

Es wurden zahlreiche Studien zur Ermittlung der Proteinzusammensetzung der Pellikel durchgeführt. Dabei kamen Aminosäureanalysen, immunologische, histochemische, chromatografische und elektrophoretische Verfahren zur Anwendung (Armstrong 1967, Leach et al. 1967, Mayhall 1970, Sønju und Rølla 1963, Mayhall 1975, 1977, Kousvelari et al. 1980, Bennick et al. 1983, Embery et al. 1986, Rykke et al. 1990, Vacca Smith und Bowen 2000, Yao et al. 2001, Al-Hashimi und Levine 1989, Carlén et al. 1998, Carlén et al. 2003, Rüdiger et al. 2002, Kraus et al. 1973, Ørstavik und Kraus 1973, 1974, Fisher et al. 1987, Li et al. 2004, Vitorino et al. 2007, Siqueira et al. 2008).

Die Ergebnisse aus diesen Studien zeigen, dass Proteine und Glykoproteine die Hauptbestandteile der *In-vivo*-Pellikel sind. Viele an der Pellikelbildung beteiligte spezifische Proteine wurden durch die o. g. Studien identifiziert, sie sind in der folgenden zweiseitigen Tabelle zusammengefasst (Tab. 3a und b).

## 2. Einleitung

Tab. 3a: Proteine und Biopolymere der *in vivo* gebildeten Pellikel mit ihrem Molekulargewicht und Literaturquelle **Teil 1**

Protein	Pysiologische Aufgabe	Molekulargewicht (kDa)	Nachweis in der Pellikel
<b>Prolinreiche Proteine</b>	Pellikelvorläuferproteine	<b>5 bis 30</b>	Kousvelari 1980,
			Bennick et al. 1983,
			Carlén et al. 1998,
			Li et al. 2004
<b>Statherin</b>	verhindert Kalziumpräzipitation	<b>8</b>	Vacca Smith 2000,
			Yao et al. 2003,
			Li et al. 2003, 2004
<b>Histatin</b>	Zytotoxische Wirkung auf Candida-Spezies	<b>3 bis 5</b>	Vacca Smith 2000,
			Yao et al. 2003,
			Li et al. 2003, 2004
<b><math>\alpha</math>-Amylase</b>	Stärkeabbau	<b>54 bis 57</b>	Vacca Smith 2000,
			Hannig M et al. 2001,
			Al-Hashimi 1989,
			Carlén et al. 1998,
			Li et al. 2003,
			Rüdiger et al. 2002,
			Ørstavic 1974 a, b,
			Li et al. 2004,
Hannig C et al. 2004			
<b>Glykosyltransferasen</b>	Katalysator, synthetisiert Glucane	<b>140</b>	Vacca Smith 2000,
			Scheie et al. 1987
			Hannig C et al. 2008
<b>Carboanhydrase VI, I, II</b>	Säureneutralisation	<b>42</b>	Vacca Smith 2000,
			Li et al. 2004,
			Leinonen et al. 1999
<b>Lysozym</b>	antibakterieller Effekt, Auflösung der Zellmembran	<b>14</b>	Vacca Smith 2000,
			Li et al. 2003,
			Kraus et al. 1973,
			Ørstavic 1973, 1974,
			Li et al. 2004
<b>Lactoferrin</b>	eisenbindendes Glycoprotein, antibakterielle Eigenschaften	<b>80</b>	Vacca Smith 2000,
			Rüdiger et al. 2002,
			Kraus et al. 1973,
			Li et al. 2004
<b>Muzin MG-1</b>	Lubrikation	<b>&gt;1000</b>	Vacca Smith 2000,
			Al-Hashimi 1989,
			Li et al. 2003
<b>Muzin MG-2</b>	Lubrikation	<b>200 bis 250</b>	Vacca Smith 2000,
			Carlén et al. 1998,
			Fisher et al. 1987

## 2. Einleitung

Fortsetzung von Tabelle 3a:

Tab. 3b: Proteine und Biopolymere der *in vivo* gebildeten Pellikel mit ihrem Molekulargewicht und Literaturquelle **Teil 2**

Protein	Pysiologische Aufgabe	Molekulargewicht (KDa)	Nachweis in der Pellikel
<b>Cystatin SA-1, -SN</b>	antibakterielle und antivirale Eigenschaften	<b>9</b>	Vacca Smith 2000,
			Yao et al. 2001
			Al-Hashimi 1989
<b>Albumin</b>	Transportfunktion, Regulation des kolloidosmotischen Druckes	<b>69</b>	Yao et al. 2001,
			Li et al. 2003,
			Carlén et al. 2003,
			Rüdiger 2002
<b>slgA</b>	Immunantwort, verhindert bakterielle Adhäsion	<b>60 und 90</b>	Al-Hashimi 1989,
			Carlén et al. 1998,
			Rüdiger et al. 2002,
			Kraus et al. 1973,
			Ørstavik 1973,
Li et al. 2004			
<b>IgM</b>			Kraus et al. 1973
<b>IgG</b>			Carlén et al. 1998,
			Rüdiger et al. 2002,
			Kraus et al. 1973,
			Ørstavik 1973,
			Li et al. 2004
<b>Komplementfaktor 3/3c</b>	Aktivierung Komplementsystem	<b>210 (80 und 130)</b>	Kraus et al. 1973
<b>Fibrinogen</b>	Faktor I der Blutgerinnung	<b>340</b>	Carlén et al. 1998,
			Rüdiger et al. 2002,
			Ørstavik 1973
<b>Fibronectin</b>	Strukturprotein	<b>230</b>	Carlén et al. 1998,
			Rüdiger et al. 2002
<b>Calgranulin B</b>	Kalziumbindung	<b>13</b>	Yao et al. 2003
<b>Cytokeratin 13, 15</b>	Zellprotein	<b>40 bis 67</b>	Yao et al. 2003
<b>Agglutinin</b>	bakterielle Agglutination	<b>300 bis 400</b>	Carlén et al. 1998
<b>Neuramidase</b>	Freisetzung von Sialinsäuren	<b>variabel</b>	Pruitt et al. 1969
			Rosan und Lamont 2000
<b>Peroxidase</b>	Hydrolyse von Radikalen	<b>78, 80, 28</b>	Göcke et al. 2002
			Pruitt und Adamson 1977
			Hannig C et al. 2008

Al-Hashimi und Levine identifizierten 1989  $\alpha$ -Amylase, Cystatin, MG 1 und slgA als Hauptbestandteile der Pellikel. Die Studien von Eggen und Rølla aus den Jahren 1982 und 1983 befinden ein Glykoprotein mit 15 kDa als Hauptprotein der Pellikel. Armstrong stellte 1971 fest, dass sich die Aminosäurezusammensetzung der Pellikel deutlich von der des Speichels unterscheidet, womit die Selektivität der Bioadhäsionsprozesse begründet wurde.

### 2.8.1.1 Prolinreiche Proteine (PRP`s)

Prolinreiche Proteine, aufgrund der Erst-Adsorption an der Schmelzoberfläche auch Pellikel-Vorläuferproteine genannt (Kousvelari et al. 1980, Bennick et al. 1983, Embery et al. 1986), besitzen eine besonders große Affinität zum Hydroxylapatit (Kousvelari et al. 1980, Bennick et al. 1981, 1983).

Die Gruppe der PRP`s setzt sich aus 6 Proteinen zusammen (PRP 1, PRP 2, PIFs, PRP 3, PRP 4, PIFf). Wegen posttranslationaler Veränderungen zeigen die Proteine bei der elektrophoretischen Auftrennung kein einheitliches Laufmuster (Carlén et al. 1998).

Es können 3 Gruppen prolinreicher Proteine unterschieden werden. Die basischen PRP`s mit einem Molekulargewicht von 35 kDa, die sauren PRP`s mit 5 bis 12 kDa und die glykosylierten PRP`s mit einem etwa 40%igen Kohlenhydratanteil (Schiffner 1997, Levine et al. 1987).

Carlén et al. (1998) konnten mittels immunologischer Verfahren eine Elektrophoresebande mit 30 kDa den sauren PRP`s zuordnen. Ebenso zu den PRP`s gehören Banden im Bereich von 30 bis 70 kDa, sie unterlagen aber interindividuellen Variationen. Es wird vermutet, dass die PRP`s an der Entstehung der elektronendichten Pellikelbasisschicht beteiligt sind (Hannig M 1999 b). Sie sind an der Mineralhomöostase beteiligt, da sie an Hydroxylapatit adsorbiert die Kalzium-Präzipitation und damit das Kristallwachstum an der Schmelzoberfläche inhibieren (Aoba et al. 1984, Lamkin und Oppenheim 1993). Möglicherweise wirken sie fördernd auf die bakterielle Adhärenz (Gibbons und Hay 1989).

### 2.8.1.2 Statherin

Das saure Phosphoprotein Statherin mit einem Molekulargewicht von ca. 8 kDa (Oppenheim et al. 1987) weist ebenfalls eine hohe Affinität zu Hydroxylapatit auf (Lamkin und Oppenheim 1993, Al-Hashimi und Levine 1989, Schüpbach et al. 2001). Statherin dient als Lubrikant (Ramasubbu et al. 1993), inhibiert die Kalzium-Phosphatsalz-Präzipitation an der Schmelzoberfläche und fördert neben der bakteriellen Adhäsion auch die Adhärenz von *Candida albicans* (Gibbons und Hay 1988, Johansson et al. 2000).

### **2.8.1.3 Histatin**

Die Histatine sind Polypeptide mit einem Molekulargewicht von 3 bis 5 kDa (Schüpbach et al. 2001). Aufgrund ihrer zytotoxischen Eigenschaften gegenüber Bakterien und Pilzen stellen sie einen elementaren Bestandteil der Immunabwehr dar (Pollock et al. 1984, Xu et al. 1991, Edgerton und Koshlukova 2000).

### **2.8.1.4 $\alpha$ -Amylase**

Die  $\alpha$ -Amylase, als einer der Hauptbestandteile der Pellikel (Al-Hashimi und Levine 1989), wird überwiegend von der Glandula parotidea sezerniert (Hannig C et al. 2004) und liegt in 4 multiplen Formen, davon 2 als Glycoproteine, vor. Bei allen Erscheinungsformen ist der Proteinanteil identisch (Buddecke 1981). Ihr Molekulargewicht beträgt zwischen 54 und 57 kDa. Die glykosylierte Form weist 57 kDa, und die nicht-glykosylierte Form 54 kDa auf (Karlson 1988, Mayo und Carlson 1974). Die  $\alpha$ -Amylase dient dem enzymatischen Stärkeabbau, möglicherweise stellt sie auch aufgrund ihrer hochaffinen Bindung zu bestimmten Streptokokken-Spezies einen Rezeptor für die mikrobielle Adhäsion an der Pellikel dar (Edgerton et al. 1993, Scannapieco et al. 1993, Hannig C et al. 2005).

### **2.8.1.5 Glykosyltransferasen (Isoformen B, C, D)**

Die von *Streptokokkus mutans* gebildeten Glykosyltransferasen haben ein Molekulargewicht von 140 kDa (Chia et al. 1995), und sind sowohl im Speichel als auch in der Pellikel nachweisbar (Schilling und Bowen 1988). Die enzymatische Aktivität bleibt auch nach ihrer Adsorption an die Pellikel erhalten (Scheie et al. 1987, Hannig C et al. 2008)). Sie spielt eine entscheidende Rolle bei der bakteriellen Adhäsion, indem sie Kohlenhydrate auf der Bakterienmembran mit Kohlenhydraten der Pellikel über 1, 3-glykosidische Bindungen verknüpft (Rølla 1989).

### 2.8.1.6 Carboanhydrasen

Die Carboanhydrase wird von den Azinuszellen der Speicheldrüsen sezerniert und liegt in Isoformen vor (Murakami und Sly 1987). Das Isoenzym II ist an der Bildung von Bikarbonationen beteiligt, und ist somit das essentielle Enzym für die Pufferkapazität des Speichels (Ericsson 1959, Parkkila et al 1990). Andere Isoformen sind die Carboanhydrase I und VI (42 kDa), sie wurden mittels immunologischer Verfahren als Bestandteile der Pellikel identifiziert (Deimling et al. 2007). Auch die Carboanhydrase bleibt nach der Adsorption enzymatisch aktiv und dient der Säureelimination und damit im weiteren Sinne den kariesprotektiven Eigenschaften der Pellikel (Leinonen et al. 1999).

### 2.8.1.7 Lysozym

Das basische antibakterielle Lysozym (14 kDa) kann durch die Spaltung des Mureins bakterieller Zellmembranen zur Auflösung (Lyse) der Mikroorganismen beitragen (Buddecke 1981). Wie alle bislang in der *In-situ*-Pellikel untersuchten Enzyme behält auch Lysozym nach Adsorption in der Pellikel im immobilisierten Zustand seine enzymatische Funktion bei (Kraus et al. 1973, Ørstavik und Kraus 1974, Rølla et al. 1983, Ruan et al. 1986, Hannig C et al. 2004, Hannig C et al. 2005, Pruitt et al. 1969, Vacca Smith und Bowen 2000, Hannig C et al. 2009). Auch eine aktuelle Studie (Hannig C et al. 2005) konnte nachweisen, dass die häufigsten in der Pellikel adsorbierten Enzyme Lysozym und Amylase ihre enzymatische Aktivität im gebundenen Zustand beibehalten und dass diese durch die Aktivität von im Speichel frei gelöster Amylase und Lysozym und die werkstoffspezifischen Eigenschaften dentaler Restaurationsmaterialien kaum beeinflusst wird. Lysozym kann bakterielle Autolysine aktivieren (Laible und Germaine 1985), Bakterien aggregieren und somit letztlich auch die Säureproduktion in der Plaque hemmen (Twetman et al. 1986).

Deimling et al. (2007) konnten zeigen, dass Lysozym, sIgA, Laktoferrin und Carboanhydrase I und II in allen Pellikelschichten randomisiert verteilt vorkommen. Nach einer Pellikelbildungszeit von 120 Minuten konnten signifikant größere Mengen dieser Proteine gefunden werden als nach 30 Minuten. Bei bukkal gebildeten Pellikeln konnte gegenüber den von palatinalen Lokalisationen signifikant mehr Lysozym und Laktoferrin gefunden werden.

### **2.8.1.8 Laktoferrin**

Laktotferrin (80 kDa) ist ein eisenbindendes Glykoprotein (Arnold et al. 1980), das hauptsächlich von den kleinen Speicheldrüsen sezerniert wird (Brandtzaeg 1971). Es kommt in 3 Erscheinungsformen vor, eine eisenfreie und für die Immunabwehr bedeutsame Variante (Schiffner 1997), eine teilweise gebundene und eine vollständig eisengebundene Form. Laktoferrin wirkt auf Mikroorganismen, die auf Eisen für ihre Entwicklung angewiesen sind, wachstumshemmend (Hellwig et al. 1999). Laktoferrin konnte als Pellikelbestandteil identifiziert werden (Vacca-Smith und Bowen 2000, Li et al. 2004, Deimling et al. 2007).

### **2.8.1.9 Hochmolekulare Muzine MG-1 und MG-2**

Hochmolekulare Muzine (Glykoproteine) stellen den Hauptbestandteil an dem die gesamten Mundhöhlenoberflächen bedeckenden viskösen „Speichelfilm“ dar. Funktionell dient dieser als Lubrikant zur Verringerung der Friktion zwischen oralen Oberflächen; er bildet eine semipermeable Membran, die vor chemischen und mechanischen Einflüssen schützt (Tabak 1995).

Bislang konnte man die Speichelmuzine MG-1 (15% Proteinanteil, Molekulargewicht >1000 kDa) und MG-2 (30% Proteinanteil, Molekulargewicht 200 bis 250 kDa) isolieren und charakterisieren (Levine et al. 1987, Tabak 1995). Sie kommen besonders häufig im Speichel der Sublingual- und Submandibulardrüsen vor, und unterscheiden sich je nach ihrem Bildungsort hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung (Veerman et al. 1991, 1996).

MG-1 und MG-2 wurden auch in der Pellikel detektiert (Vacca Smith, Al-Hashimi, Carlén 1998, Li 2003).

MG-1 kann mit anderen Speichelproteinen, wie z.B. Amylase, PRP, Statherin und Histatin, Komplexe bilden, die einen möglichen Schutz vor Proteolyse bieten und als Reservoir für Vorläuferproteine dienen können (Iontcheva et al. 1997).

### **2.8.1.10 Cystatine**

Zu den Cystatinen zählt man cysteinreiche Proteine wie Cystein selbst, Proteaseinhibitoren und Proteine mit antibakteriellen und antiviralen Eigenschaften (Bobek und Levine 1992). Cystatine enthalten saure und neutrale Peptide und wirken ebenfalls der Präzipitation von Kalziumphosphatsalzen entgegen (Johnson et. al 1991). Das Molekulargewicht von Cystatin SN liegt bei 9 kDa (Yao et al. 2001).

### **2.8.1.11 Albumin**

50 bis 60% der Serumproteine sind Albumine. Sie sind für den Transport von Fetten, Vitaminen, Spurenelementen und Pharmaka verantwortlich und besitzen eine hohe Wasserbindungsfähigkeit (Löffler und Petrides 1997). Das Molekulargewicht der in Speichel und Pellikel nachgewiesenen Albumine beträgt 69 kDa (Rølla et al. 1983, Carlén et al. 1998, Yao et al. 2001). Albumine sind evtl. an der Hemmung der Schmelzdemineralisation beteiligt (Arends et al. 1986).

### **2.8.1.12 Immunglobuline sIgA, IgG und IgM**

Immunglobuline sind in Speichel und Pellikel nachweisbar (Al-Hashimi und Levine 1989). Ihre Grundstruktur besteht aus über Disulfidbrücken miteinander verbundenen Polypeptidketten, 2 schwere (55 kDa) und 2 leichte (25 kDa) symmetrische Ketten. Sekretorisches IgA besitzt darüber hinaus einen sekretorischen Bestandteil, mittels dessen die Moleküle durch Endozytose in die Azinuszellen der Drüsen gelangen können (Buddecke 1981).

Im Elektrophoresegel ist sIgA als Doppelbande zu erkennen. Seine sekretorische Komponente hat ein Molekulargewicht von 90 kDa und die schwere Kette von 60 kDa. Carlén et al. (1998) konnten es in der *in vivo*- und *in vitro* gebildeten Pellikel nachweisen. sIgA gehört durch Neutralisierung und Opsonierung zur ersten Immunabwehr des Organismus.

Das möglicherweise in den kleinen Speicheldrüsen gebildete (Smith et al. 1991) oder über Sulcusfluid sezernierte (Aaltonen et al. 1985, Tenovuo et al. 1991) IgG und IgM konnten 1973 von Kraus et al. in der Pellikel nachgewiesen werden.

### 2.8.1.13 Komplementfaktoren 3 und 3c

Diese Proteine (210 kDa) sind Bestandteil des Komplementsystems im Serum und gelangen evtl. über Gingivaexsudate in die Pellikel (Brandtzaeg et al. 1970), in der sie auch nachgewiesen werden konnten (Kraus et al. 1973). Die Proteine sind aus zwei Polypeptidketten aufgebaut, einer  $\alpha$ - (130 kDa) und einer  $\beta$ -Kette (80 kDa).

### 2.8.1.14 Fibrinogen

Fibrinogen (340 kDa) ist ebenfalls ein Plasmaprotein, das in der Pellikel nachgewiesen werden konnte (Kraus et al. 1973, Ørstavik und Kraus 1974, Rüdiger et al. 2002).

Auch Carlén et al. (2003) fanden die Plasmabestandteile Fibrinogen, Fibronectin, Albumin und IgG in der *In-vivo*-Pellikel. Dabei stellten sie fest, dass diese Proteine anteilmäßig in höherer Konzentration in den gingivalen Pellikelabschnitten als in den inzisalen Abschnitten zu finden waren. Im Zusammenhang mit einer erhöhten Sulcusfließrate während einer Gingivitis waren auch in den inzisalen Abschnitten der Pellikel diese Proteine vermehrt zu finden (Carlén et al. 2003, Rüdiger et al. 2002).

### 2.8.1.15 Fibronectin

Fibronectin ist ein proteaseempfindliches Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 230 kDa (Rüdiger et al. 2002), das bei sehr vielen physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielt.

### 2.8.1.16 Agglutinin

Das Glykoprotein Agglutinin hat ein Molekulargewicht von 300 bis 400 kDa (Ligtenberg et al. 2001). Es bewirkt die Agglutination (Verklumpung) von Mutans-Streptokokken (Ericson und Rundegren 1983) und wurde mit Hilfe immunologischer Verfahren in der Pellikel identifiziert (Carlén et al. 1998, Rüdiger et al. 2002). Es fördert die Adhäsion von Mutans-Streptokokken an die Pellikel und die Bindung zwischen Streptokokkus mutans und Streptokokkus sangius (Carlén und Olsson 1995, Carlén et al. 1996, Carlén et al. 1998).

### 2.8.1.17 Neue Untersuchungsmethoden zur Proteinanalyse

Das Verfahren MALDI-TOF (**M**atrix **A**ssisted **L**aser-**D**esorption / **I**onisation – **T**ime of **F**light Massenspektrometer) dient zur Massenanalyse chemischer Verbindungen und wurde in einer Studie von Yao et al. (2001) zur Analyse der Pellikelproteine erstmals verwendet. Man ionisiert dabei den Analyten mittels Laserbeschuss (337nm) über eine Matrix, in der das eigentlich zu analysierende Material eingebettet ist. Dazu werden das zu untersuchende Polymer und die oligomere Matrix auf einen metallischen Träger aufgetropft und das Lösungsmittel entfernt. Durch Laserbeschuss verdampft die Matrix explosionsartig und die zu untersuchenden Polymere werden mitgerissen. Dabei findet die Ionisierung der Polymere statt. Die entstandenen Ionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt. Aufgrund der gepulsten Ionenerzeugung wird die Massenanalyse mit einem TOF-Analysator (Time of flight) durchgeführt.

Mit dieser Methode konnte gezeigt werden, dass es in einer *in vitro* gebildeten Pellikel mehr intakte Speichelproteinarten als in einer *in vivo* gebildeten Pellikel gibt. Diese Tatsache ist höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Bestandteile der *In-vivo*-Pellikel im Gegensatz zu der *In-vitro*-Pellikel einer umfangreichen enzymatischen Proteolyse ausgesetzt waren. Daher können *In-vitro*-Pellikel nicht die Verhältnisse in der Mundhöhle widerspiegeln (Yao et al. 2001, Hannig C und Hannig M 2009). Die für die *In-vitro*-Versuche verwendeten Speichelüberstände weisen eine andere proteolytische Kapazität als der Speichel in der Mundhöhle auf. Außerdem handelt es sich bei den verwendeten Speichelproben um geschlossene Systeme, während die Mundhöhle ein offenes System darstellt (Yao et al. 2001).

Durch Kombination von elektrophoretischer Auftrennung und MALDI-TOF konnten in der *In-vivo*-Pellikel intaktes **Histatin 1**, **Csytatin SN**, **Statherin**, **Lysozym**, **Albumin**, und **Amylase** identifiziert werden (Yao et al. 2003, Yao et al. 2001).

Erstmals konnten Yao et al. (2001) mittels MALDI-TOF die intakten **Cytokeratine 13** und **15**, sowie **Calgranulin B** als Bestandteile der Pellikel und der Sulcusflüssigkeit nachweisen. Der Nachweis von Cytokeratinen in der Pellikel belegt, dass auch das orale Epithel als Lieferant für Pellikelproteine dient.

Vitorino et al. (2004) konnten mittels 2-D-Elektrophorese und MALDI-TOF 19 Speichelproteine in der *In-vitro*-Pellikel identifizieren. Sie detektierten Poly-Ig-

Rezeptor, Serumalbumin, IgA- $\alpha$ -Kette,  $\alpha$ -Amylase, Carboanhydrase VI, Zink- $\alpha$ -2 Glykoprotein, IgK/ $\lambda$  leichte Kette, Prolaktin, Cystatin S, Cystatin SA-III, Calgranulin B, Cystatin SN, Lysozym,  $\beta$ 2-Mikroglobulin, Histatin 1, Cystatin D, PRP`s und Cystatin C.

In jüngster Zeit kam auch die Bildung monoklonaler Antikörper zum Nachweis kleinster Proteinmengen zur Anwendung (Li et al. 2003, 2004). Immunologische Verfahren sind für die Identifizierung kleinster Mengen von Antigenbestandteilen immer dann besonders geeignet, wenn diese eine ausreichende Immunreaktion bewirken, um die Antikörperproduktion durch das Immunsystem anzuregen. Je öfter das Immunsystem mit Antigenen konfrontiert wird, desto verstärkter fällt die Immunantwort aus und ermöglicht damit auch die Detektion geringster Spuren von Pellikelproteinen. Mäuse wurden durch intraperitoneale Injektion mit menschlichem *In-vivo*-Pellikelmateriale immunisiert. Dabei konnten von den Versuchstieren Antikörper gegen muköses Glykoprotein 1 (MG-1), PRP`s, Statherin, Histatin, Albumin, Amylase, sIgA, IgG, IgM, Laktoferrin, Lysozym und Carboanhydrase II gewonnen werden (Li et al. 2003, 2004). Diese Studie zeigte, dass die o. g. Proteine integrale Bestandteile der Pellikel sind.

### 2.8.2 Aminosäuren

Ca. 45 % der Pellikel besteht aus Aminosäuren (Armstrong 1967). Frühere Studien beschränkten sich darauf, das durch Säure chemisch oder mit Scalern mechanisch gewonnene Pellikelmateriale (Leach et al. 1967) nach Hydrolysierung chromatographisch zu untersuchen (Armstrong 1967, 1971, Mayhall 1970, 1975).

Die Häufigkeitsverteilung der gefundenen Aminosäuren lässt keine weitergehenden Aussagen über die in der Pellikel enthaltenen Proteine zu.

In der 2h-Pellikel finden sich hohe Anteile saurer Aminosäuren wie Glutamin- und Asparaginsäure und hohe Anteile von Alanin, Glycin, Serin und Prolin (Armstrong 1966, 1967, Leach et al. 1967, Armstrong und Hayward 1968, Mayhall 1970, 1975, Sønju und Rølla 1973, Eggen und Rølla 1982, 1983). Basische und schwefelhaltige Aminosäuren konnten nur in geringem Maße gefunden werden (Sønju et al. 1986). Manche Studien konnten auch die in Bakterienzellwänden vorkommende Murainsäure nachweisen (Armstrong und Hayward 1968).

Sønju und Rølla (1973) kamen in ihrer Studie zu dem Schluss, dass die Aminosäurezusammensetzung der Pellikel aus verschiedenen Regionen der Mundhöhle und von verschiedenen Individuen nahezu identisch sei. Nur Nahrungsmittel und Getränke zeigten einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Pellikel (Rykke und Sønju 1991). So konnten Vacca Smith und Bowen (2000) zeigen, dass Milch und Saccharose, Sorbit und Xylitol zu Veränderungen im Aufbau der Pellikel führen konnten. Van der Mei et al. (2002) betrachten Nahrungsbestandteile als wesentliche Bestandteile der Pellikel.

### 2.8.3 Kohlenhydrate

Ein weiterer Bestandteil der Pellikel sind die Kohlenhydrate, wobei die Glukose mehr als die Hälfte der Gesamtmenge ausmacht (Sønju et al. 1974, Sønju 1975). Mayhall und Buttler (1976) fanden heraus, dass Glukose 20%, Galaktose 27%, Mannose 9%, Glukosamin 18% und Galaktosamin 14% der Kohlenhydrate der *in vivo* gebildeten Pellikel ausmachen. Sønju et al. (1974) fanden in frisch gewonnener Pellikel 65% Glukose, 9,5% Galaktose, 19% Glukosamin und 6,5% Mannose. Daneben konnten auch Fucose sowie N-Acetyl-Neuraminsäure und andere Sialinsäuren in der Pellikel detektiert werden (Sønju et al. 1974, Sønju 1975, Mayhall und Buttler 1976, Hay 1969, Mayhall 1970, 1977). Der Ursprung der Glukose in der Pellikel wird kontrovers diskutiert. Eine Möglichkeit wäre, dass die Glukose von den Speichelglykoproteinen abstammt (Mayhall und Buttler 1976). Da der Glukosegehalt der Glykoproteine aber nur sehr gering ist, ist diese Annahme eher unwahrscheinlich. Eine wahrscheinlichere Möglichkeit besteht darin, dass die direkte Adsorption der Glukosepolymere (Glukane) aus bakteriellem Ursprung zum Glukosegehalt der Pellikel beiträgt. Vermutlich synthetisieren auch die in der Pellikel enthaltenen Glykosyltransferasen die Glukane. Desweiteren wurden Glykolipide, welche die Hauptlipidbestandteile der Pellikel sind, als Glukosequelle diskutiert, da der Kohlenhydratanteil der Glykolipide ausschließlich aus Glukose besteht (Slomiany et al. 1986).

### 2.8.4 Lipide

Der Lipidgehalt der Pellikel wurde noch nicht gründlich erforscht, obwohl die Lipide ein bedeutender Bestandteil der *in vivo* gebildeten Pellikel zu sein scheinen (Slomiany et al. 1986). Der Gesamtlipidgehalt der Pellikel liegt bei 22 bis 23 % des Trockengewichtes der Pellikel und machen einen wesentlichen Bestandteil des initialen Biofilms aus (Slomiany et al. 1986, Slomiany et al. 1990), damit ist der Lipidanteil in der Pellikel deutlich höher als im Speichel. Die hauptsächlich in der Pellikel zu findenden Lipidgruppen sind: a) die Neutralfette, die reich an freien Fettsäuren, Triglyzeriden, Cholesterin und Cholesterylestern sind, b) die Phospholipide, die einen hohen Gehalt an Phosphatidylethanolaminen, Sphingomyelin und Phosphatidylcholinen besitzen, und c) die Glykolipide, die aus Neutral- und sulfatierten Glycerolglykolipiden bestehen.

Interindividuelle Unterschiede bzgl. der Lipidzusammensetzung und –konzentration in der Pellikel könnten Unterschiede in der Kariesaktivität der Individuen reflektieren (Slomiany et al. 1990). Diese Beobachtung wurde durch die Fähigkeit der Lipide erklärt, die Diffusion von Milchsäure durch die Pellikel zu behindern und somit säureprotektiv zu wirken (Slomiany et al. 1986).

Andere Erklärungsversuche beziehen sich auf die Fähigkeit der Phospholipide, die physikalischen Eigenschaften der Pellikel dahingehend zu verändern, dass durch Interaktion mit Muzinen die Zähigkeit der Pellikel erhöht wird, und somit die säureprotektiven Eigenschaften verbessert werden (Slomiany et al. 1990).

### 2.9 Pellikelbildung und bakterielle Adhärenz auf verschiedenen Festkörperoberflächen.

Bislang liegen keine eindeutigen Studienergebnisse darüber vor, ob die intraorale Proteinadsorption und die anschließende bakterielle Adhärenz auf künstlichen Substratoberflächen eigenen Gesetzmäßigkeiten unterliegen oder aber mit denen an der Schmelzoberfläche übereinstimmen.

Es konnten in einigen Studien sowohl quantitative als auch qualitative Unterschiede hinsichtlich der Proteinzusammensetzung der *in vivo* gebildeten Pellikel auf unterschiedlichen Substratoberflächen nachgewiesen werden (Sønju und Rølla

1972, Sønju und Glantz 1975, Sønju und Skjørland 1976, Lam Watt und Bennick 1981, Fine et al. 1984, Ruan et al. 1986, Fisher et al. 1987).

Baier (1978), Carlén et al. (2001), Sønju und Glantz (1975 und 1976) vermuteten eine mögliche Selektivität der Proteinadsorption in Abhängigkeit von der Substratoberfläche. Trotz der Annäherung der freien Oberflächenenergie (Benetzbarkeit) verschiedener Substratoberflächen an einen ähnlichen Wert als Folge der Pellikelbildung (Hannig M et al. 2004, Jendresen und Glantz 1981), wird die anschließende bakterielle Akkumulation in gewissem Umfang durch die freie Oberflächenenergie der jeweiligen Festkörper determiniert (Quirynen et al. 1989, Van Dijk et al. 1988, Weerkamp et al. 1989). Es wurde deshalb angenommen, dass der adsorbierte Proteinfilm die Oberflächeneigenschaften der Substratoberflächen widerspiegeln bzw. festkörperinduzierte Determinanten für die bakterielle Adhärenz besitzen müsste. Unterschiede in der molekularen Zusammensetzung der adsorbierten Proteinschichten, der Menge der adsorbierten Proteine im zeitlichen Ablauf des Adsorptionsprozesses sowie in der Art der Oberflächenbedeckung wurden als mögliche Ursachen für den substratinduzierten Transfer von Oberflächeneigenschaften in die Pellikelschicht diskutiert (Hannig M 1998).

In klinischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Adhäsion von Mikroorganismen auf verschiedenen zahnärztlichen Restaurationsmaterialien in unterschiedlicher Ausprägung verläuft (van Dijk et al. 1987 a, Krämer et al. 1989, 1990, Simonis et al. 1989, 1990, Weerkamp et al. 1989, Hahn et al. 1992, 1993).

Keramiken werden in geringerem Umfang bakteriell besiedelt als der natürliche Zahnschmelz. Kunststoffe und Komposite zeichnen sich durch eine ausgeprägte Tendenz zur mikrobiellen Adhäsion aus (Laratto 1972, Normann et al. 1972, Skjørland 1973, 1976, Weitman und Eames 1975, Wise und Dykema 1975, Skjørland und Sønju 1982, Chan und Weber 1986, Savitt et al. 1987, Jensen et al. 1989, Svanberg et al. 1990 a, b).

Erklärt werden diese Phänomene zum einen mit der unterschiedlichen Oberflächenbeschaffenheit der Werkstoffe (Gildenhuys und Stallard 1975, Lindemeyer et al. 1981, Smales 1981, Skjørland et al. 1982, Adamcyk und Spiechowicz 1990). Zum anderen werden materialspezifische Charakteristika der Werkstoffoberflächen dafür verantwortlich gemacht (Busscher et al. 1984 c, Uyen et al. 1985, Pratt-Terpstra et al. 1987, 1989, Van Dijk et al. 1987 a, Weerkamp et al. 1989). Auch antibakterielle Eigenschaften der Materialien könnten für die

Unterschiede in Betracht kommen, so z.B. bei metallischen Restaurationen (Ørstavik 1985, Augthun und Brauner 1988, Meryon und Johnson 1989).

Hochinteressante Erkenntnisse zeichnen sich in einer aktuellen Studie (Schwender et al. 2005) ab, bei der die Haftkräfte einzelner Proteine an unterschiedlichen Materialien untersucht werden. Es kristallisieren sich deutliche Unterschiede in den Adhäsionskräften ab, woraus sich ebenfalls die klinische Beobachtung der unterschiedlich ausgeprägten bakteriellen Akkumulation in Abhängigkeit vom Werkstoff erklären lassen könnte.

Werkstoffe wie Glasionomere zemente und entsprechend angereicherte Komposite können in gewissem Umfang Fluoride freisetzen (Shen 1985, Arends und Ruben 1988, Arends und Van der Zee 1990, Swift 1989 a, b, Hörsted-Bindslev und Larsen 1990, Behnen et al. 1990). Fluoride können direkt antibakteriell wirksam sein (Kawai et al. 1990, Tatevossian 1990 b, Van Loeven 1990), aber auch Einfluss auf die Benetzbarkeit der Werkstoffoberfläche, und damit auch die bakterielle Besiedlung nehmen (Busscher et al. 1984 c, De Jong et al. 1984 b, Perdok et al. 1988).

Hannig C et al. (2006) untersuchten den werkstoffspezifischen Einfluss verschiedener Substrate wie Titan, Goldlegierung, Kunststoff, Komposit, Amalgam, Keramik, Schmelz und Dentin auf die Aktivität von Amylase und Lysozym, welche die häufigsten Enzyme in der *in situ* gebildeten Pellikel sind. Nach einer 30-minütigen bukkalen intraoralen Exposition zeigten alle untersuchten Pellikel Amylase- und Lysozymaktivitäten, wobei große intra- und interindividuelle Unterschiede zu beobachten waren. Die Aktivität der im Speichel gelösten Enzyme hatte nur einen geringen Einfluss auf die Aktivität der in der Pellikel gebundenen Enzyme. Amylase und Lysozym sind auf allen untersuchten Werkstoffoberflächen aktiv.

In einer weiteren Studie konnten Hannig C et al. (2007) zeigen, dass auch das Substrat und die Pellikelbildungszeit keinen signifikanten Einfluss auf die Menge der in der Pellikel detektierten Enzyme hatten. Es konnte allgemein eine signifikant größere Menge Lysozym gegenüber von Amylase gefunden werden.

### **2.10 Methoden der *In-vivo*-Pellikelgewinnung**

Zur Pellikelgewinnung sind mechanische, chemische und kombinierte Methoden entwickelt worden (Armstrong 1967, Hay 1967, Leach et al. 1967, Armstrong und

Hayward 1968, Sønju und Rølla 1973, Embery et al. 1986, Al-Hashimi und Levine 1989, Sønju Clasen et al. 1997, Carlén et al. 1998, Yao et al. 2001).

Ziel war es, von Speichel, Bakterien und anderen Verunreinigungen freie Pellikel zu gewinnen. Bei allen Methoden konnten nur sehr geringe Mengen Pellikelmateriale gewonnen werden, und bei keiner Methode konnte nachgewiesen werden, dass die Pellikel vollständig und ohne Reste von der Oberfläche abgelöst werden kann (Al-Hashimi und Levine 1989, Yao et al. 2001, Hannig M et al. 2005).

Sønju und Rølla entwickelten 1973 eine Methode, bei der frisches Pellikelmateriale *in vivo* gewonnen werden konnte. Die Probandenzähne wurden mit Bimspulver professionell gereinigt. Nach 2 Stunden absoluter Nahrungskarenz wurde die neu gebildete Pellikel nach Spülung der Mundhöhle mit Wasser und Isolierung mit Kofferdam mit Luft getrocknet, mit Scalern von der Schmelzoberfläche gewonnen und anschließend auf Glaswolle oder PVDF-Membranen gesammelt. (Sønju und Rølla 1973, Sønju Clasen et al. 1997).

Embery et al. (1986) entfernten die Pellikel schrittweise. Die Pellikel wurde über einen Zeitraum von 5 Minuten mit Kalziumchloridlösung behandelt, um dadurch lockere Proteine zu lösen. Danach wurde die verbliebene Pellikel nach der Methode von Sønju et al. (1973) entfernt. In der äußeren Pellikelschicht fanden sich v. a. hochmolekulare Moleküle, in der Basisschicht hauptsächlich niedermolekulare Proteine.

Die neueren Verfahren lösen die Pellikel direkt mit Schwämmchen oder Membranen von der Zahnoberfläche (Carlén et al. 1998, Yao et al. 2001).

Carlén et al. (1998) verglichen die Effektivität verschiedener Lösungen wie 0,15 mol/l Phosphatpuffer, 4 mmol/l EDTA und 2%ige SDS-Lösung zur Pellikelgewinnung, wobei sich die SDS-Lösung als die effektivste erwies.

Yao et al (2001) konnten den Nachweis erbringen, dass durch die Zahnreinigung mit Bimspulver keine vollständige Entfernung der Pellikel von der Zahnoberfläche möglich ist. Auch mittels in 0,5 M Natriumhydrogencarbonatlösung getränkten PVDF-Membranen konnten nicht alle Proteine von der Zahnoberfläche entfernt werden.

Hannig M et al. (2005) konnten beim Vergleich verschiedener chemischer und mechanischer Methoden zur Pellikelgewinnung zeigen, dass die kombinierte Anwendung von Schwämmchen-Methode und anschließender EDTA-Behandlung die schrittweise Gewinnung der globulären und der basalen Pellikelschicht am effektivsten möglich ist.

### 2.11 Forschungsansätze

Möglichkeiten zur prophylaktischen Veränderung des oralen Biofilms sind z.B. die Anreicherung mit Lipiden, Phospholipiden und Lipoproteinen zur Verbesserung des Erosionsschutzes (Attin und Hannig M 2002, Slomiany et al. 1986, Slomiany et al. 1990), oder Lokalthérapeutika (z.B. Zahnpasten) mit antibakteriellen enzymatischen und nicht-enzymatischen Pellikelbestandteilen (Afseth und Rølla 1983, Etemadzadeh et al. 1985, Hahn et al. 2001, Hannig M et al. 2005, Moran et al. 1989).

Aus Krill konnte ein Proteasepräparat gewonnen werden, welches mittels Endo- und Exopeptidasen Mikroorganismen aus der vorhandenen Plaque herauslösen kann (Hahn et al. 2001).

Da die Mundhöhle ein offenes System mit hoher Clearancerate (Flüssigkeitsaustausch) ist, können diese Lösungsansätze nur funktionieren, wenn die Wirkstoffe langfristig ortsständig (in der Pellikel integriert) bleiben, also eine hohe Substantivität aufweisen (Hahn et al. 2001, Hannig M et al. 2005).

Parenterale Methoden zur aktiven Immunisierung gegen kariesverursachende Mikroorganismen wurden wegen zu hoher Nebenwirkungen wieder verworfen (Cohen et al. 1979, Everhart et al. 1985, Feretti et al. 1980, Russel et al. 2004). Neuere Ansätze der aktiven Immunisierung sehen die topische Applikation von antigenem Material an Tonsillen und Speicheldrüsen vor (Russel et al. 2004, Smith 2003). In Studien an Tieren und Menschen konnte die deutliche Reduktion der Streptokokkus-mutans-Besiedlung der Mundhöhle nachgewiesen werden, jedoch war der Impfschutz (Antikörper-Titer) schon nach einigen Monaten stark reduziert (Russel et al. 1999, Smith 2002).

Alternativ wurde die passive Immunisierung durch lokale Applikation von Antikörpern erforscht (Ma 1999), die Antikörper waren aber nur über Stunden bis zu einigen Tagen nachweisbar. Eine regelmäßige Applikation z.B. in Form von Mundspülungen wäre ein möglicher Lösungsansatz (Ma et al. 1990, Russel et al. 2004).

Möglichkeiten zur Veränderung von Materialoberflächen zur Vermeidung oder Verringerung der oralen Biofilmbildung bestehen z.B. in der antiadhäsiven Beschichtung. Raue Oberflächen begünstigen materialunabhängig die Adhärenz von Mikroorganismen, dahingegen werden Titan und verschiedene Keramiken nur verzögert mikrobiell besiedelt (Berthold et al. 1971, Berthold 1979, Carlén et al. 2001,

Quirynen et al. 1993, Grössner-Schreiber et al. 2001, Grössner-Schreiber et al. 2004, Rasperini et al. 1998, Siegrist et al. 1991).

Strukturell zeigt sich die Pellikel auf den unterschiedlichen Werkstoffen recht einheitlich und Enzymaktivitäten von Amylase und Lysozym werden von den Materialeigenschaften nicht beeinflusst (Hannig C et al. 2006, Hannig M 1997).

Die effektive Vermeidung der Bildung eines pathogenen Biofilms auf Festkörperoberflächen ist nur durch die Inhibierung der Pellikelbildung (Grundlage der bakteriellen Adhärenz) durch antiadhäsive Beschichtung bzw. durch die Verwendung von Restaurationswerkstoffen mit niedriger Oberflächenenergie, sogenannter „low energy surfaces“ zu erreichen (Christersson 1991, Glantz 1969, Hannig M et al. 2007, Meyer 1990). Voraussetzung für diese Materialien müssen dabei natürlich Mundbeständigkeit, Biokompatibilität und Abrasionfestigkeit sein.

Teflonbeschichtete Prüfkörper zeigten in klinischen Studien eine signifikant geringere Plaqueanlagerung als natürliche Zahnoberflächen (Maetani et al. 1984, Quirynen et al. 1988, Quirynen et al. 1989).

Antiadhäsive Eigenschaften nach Applikation auf der Zahnoberfläche konnten für verschiedene Beschichtungssysteme, wie z.B. solche auf der Basis von Alkylphosphaten in Verbindung mit nicht-ionischen Surfactants oder auch Silanen mit Siloxanpolymeren oder Triclosan und Polyaspartate nachgewiesen werden, sie erwiesen sich aber als nicht ausreichend abrasionsstabil und unbeständig (Ellingsen und Rølla 1994, Guan et al. 2003, Olsson et al. 1991, Rølla et al. 1994, Yoshino und Teranaka 1997).

Ein interessanter Lösungsansatz stellt sich in der Beschichtung mit einem polymerisierbaren, abrasionsstabilen, hydrophoben und antiadhäsiv wirkenden Niedrigenergiwerkstoff dar (Hannig M et al. 2007). Das hitzopolymerisierte Nanokomposit auf Basis von Perfluoro-Alkoxy-Silanen und Metalloxiden verursacht ein Abschilfern des adhärenen Biofilms von der beschichteten Zahnoberfläche und führt zu einer deutlich reduzierten Biofilmbildung *in situ*.

### 2.12 Fragestellung

Auf allen intraoralen Festkörperoberflächen kommt es innerhalb kürzester Zeit zur Ausbildung einer Pellikelschicht, deren Grundlage die Adsorption von Proteinen, Glykoproteinen und Makromolekülen aus z.B. Speichel, Sulcusfluid, Blutplasmaexsudaten, mikrobiellen Proteinen oder auch Nahrungsbestandteilen ist (Hannig M und Joiner 2006, Leach et al. 1967, Mayhall 1975, Mayhall 1977, Rykke et al. 1990, Sønju und Rølla 1973, Sønju et al. 1974, Vacca Smith und Bowen 2000). Sie stellt die Grundlage zur Bildung eines Biofilms dar, der sowohl protektive Eigenschaften, wie z.B. Erosionsschutz, Lubrikation, Mineralhomöostase und antibakterielle Eigenschaften aufweist, als auch pathogene Charakteristika, wie z.B. die Fähigkeit zur bakteriellen Adhärenz (Säureproduktion) und Ausbildung einer dreidimensional strukturierten Plaque auf der primär adsorbierten Pellikelbasisschicht, besitzt, die ursächlich für die Entstehung von Karies, Parodontopathien und Erosionen ist (Hannig M und Hannig C 2006, Hannig M und Joiner 2006, Lenander-Lumikari und Loimaranta 2000, Lendenmann et al. 2000, Marsh und Bradshaw 1995, Marsh und Martin 1999).

Vorrangiges Ziel zur Entwicklung prophylaktischer Therapieansätze ist die Inhibition der Ausbildung einer pathogenen Plaque, bzw. die Verbesserung der protektiven Eigenschaften des oralen Biofilms (Hahn et al. 2001, Hannig M et al. 2005, Hannig M und Hannig C 2006, Hannig M et al. 2006).

Dazu sind umfassende Grundlagenforschungen nötig, um die Biofilmbildung auf den verschiedenen Festkörperoberflächen, die Mechanismen der Biofilmbildung und die nachfolgende bakterielle Adhärenz selbst zu ergründen. Nur auf dieser Grundlage ist die Entwicklung von neuen innovativen Therapieansätzen möglich.

Das Ziel der vorliegenden klinisch-experimentellen *In-vivo*-Studie bestand darin, das elektrophoretische Bandenmuster des *in vivo* auf 10 verschiedenen Werkstoffen zu 3 verschiedenen Zeiten an 2 unterschiedlichen Expositionsorten gebildeten Biofilms und das adsorbierte Bandenspektrum mit dem des Vollspeichels in unterschiedlichen Aufbereitungsschritten miteinander zu vergleichen und zu analysieren. Dabei sollten folgende Fragen geklärt werden:

- Gibt es Unterschiede oder Veränderungen in der Bandenverteilung und des Bandenspektrums hinsichtlich der Anzahl und des Molekulargewichts zwischen den einzelnen Werkstoffen, Lokalisationen, Zeiten und Geschlechtern?
- Wie verändert sich das Bandenspektrum der Werkstoffe beim einzelnen Probanden innerhalb der Expositionszeiten und den Lokalisationen?
- Sind die Veränderungen im Bandenspektrum probanden-, werkstoff-, zeit-, lokalisations- oder geschlechtsspezifisch?
- Sind alle Banden im Speichelgel auch im Probengel vertreten oder adsorbiert nur ein bestimmtes Spektrum der im Vollspeichel enthaltenen Biomoleküle auf den Prüfkörperoberflächen?
- Ist die Bandenverteilung innerhalb der Probanden gleich oder hat jeder Proband sein eigenes Speichelprofil und zeichnet sich dieses auch auf den Werkstoffen ab?
- Wie verändert sich das Bandenmuster der Vollspeichelproben durch die unterschiedlichen Reinigungsstufen?
- Welche Banden lassen sich dadurch möglichen Verunreinigungen wie z.B. Mikroorganismen zuordnen und sind damit auch bei den Probengelen als solche einzustufen?

## 3. Probanden, Material und Methodik

### 3.1 Probanden

Zur freiwilligen Teilnahme an der klinisch-experimentellen Studie wurden 6 gesunde Probanden im Alter zwischen 24 und 32 Jahren ausgewählt. Bei den 3 männlichen und 3 weiblichen Probanden (ein Zahnarzt und fünf Zahnmedizinstudenten im klinischen Studienabschnitt) wurden Alkohol- und Nikotinabusus, die Einnahme von Medikamenten sowie spezielle Ernährungsgewohnheiten anamnestisch ausgeschlossen. Erkrankungen der Speicheldrüsen und Allgemeinerkrankungen mit verändertem Speichelfluss lagen nicht vor. Bei der Untersuchung der Mundschleimhäute ergaben sich keine pathologischen Befunde, alle Probanden waren vollbezahnt und zum Teil konservierend versorgt. Kariöse Defekte, insuffiziente Restaurationen und marginale Parodontitiden konnten nicht diagnostiziert werden. Die Erhebung von Plaqueindex nach Sillness und Loe, Sulcusblutungsindex und Gingivaindex erbrachte für alle Probanden Werte nahe null, die Werte für den DMF-Index lagen zwischen 0 und 29. Bei keinem der Probanden konnten Taschentiefen größer als drei Millimeter gemessen werden, ebenso lag keine erhöhte Zahnsteinbildungsneigung vor.

Jeder Proband erhielt einen Aufklärungsbogen zu Durchführung und Ablauf der Studie (siehe Anhang 3) und wurde darüber hinaus persönlich aufgeklärt. Den Probanden wurde ausreichend Zeit für die Teilnahmeentscheidung eingeräumt, ein Ausscheiden war jederzeit möglich. Alle eingesetzten Materialien sind für die Anwendung am Menschen zugelassene Werkstoffe und stellen auch hinsichtlich der Verarbeitung keinerlei gesundheitliches Risiko dar.

Muster der verwendeten Bögen befinden sich im Anhang (Anhang 3, 4 und 5).

Das positive Votum der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes zur Durchführung der Studie lag vor. (AZ:238/03)

#### 3.2 Materialien und prinzipielle Verwendung

Sämtliche zur Durchführung der vorliegenden Studie verwandten Materialien sind detailliert in der Materialliste aufgeführt. Nachfolgend werden die wichtigsten Materialien und deren Verwendung beschrieben.

Zur Abformung der Kiefer wurde blend-a-print Elastic-Alginat (Procter & Gamble, Schwalbach, Deutschland) verwendet. Die Modelle wurden mit Superhartgips GC Fujirock<sup>®</sup> (G-C Dental, Tokyo, Japan) und Hartgips Moldano<sup>®</sup> blau stone Typ S (Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) hergestellt. Die Miniplastschienen wurden im Tiefziehverfahren mit hartelastischen transparenten Duran<sup>®</sup>-Folien 1,0 x 125 mm (Scheu-Dental, Iserlohn, Deutschland) gefertigt. Für die Herstellung der Prüfkörper kamen die nachfolgend aufgeführten Materialien zum Einsatz, die entsprechend den Herstellerangaben verarbeitet bzw. nur zugeschnitten wurden:

- Goldprüfkörper 8 x 8 mm, Bio Herador<sup>®</sup> N (Heraeus-Kulzer, Hanau, Deutschland)
- Keramikprüfkörper 7 x 7 mm, CEREC<sup>®</sup> VITABLOCKS<sup>®</sup> Mark II (Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Deutschland)
- Kunststoffprüfkörper 7 x 7 mm, Palapress<sup>®</sup> (Heraeus-Kulzer, Hanau, Deutschland)
- Teflonprüfkörper 7 x 7 mm aus einer 6 x 10 x 2 mm Teflonform unbek. Herstellers
- Schmelzprüfkörper 7 x 7 mm aus frisch extrahierten Rinderschneidezähnen
- Kompositprüfkörper 7 x 7 mm, XRV<sup>™</sup>Herculite<sup>®</sup> (Kerr, Scafati, Italien)
- Glasionomerzementprüfkörper 7 x 7 mm, 3M ESPE Ketac<sup>™</sup>Fil Plus Aplicap<sup>™</sup> (3M ESPE, Seefeld, Deutschland)
- Amalgamprüfkörper 7 x 7 mm, ORALLOY MAGICAPS (coltène<sup>®</sup> AG, Altstätten, Schweiz)
- Glasprüfkörper 7 x 7 mm, Objektträger 76 x 26 mm (Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland)
- Titanprüfkörper Ø 10 mm, Frios<sup>®</sup> 10-5010 (Friadent, Mannheim, Deutschland)

Die Prüfkörper wurden mit Nassschleifpapier MICRO CUT<sup>®</sup>, Ø 250 mm (BUEHLER<sup>®</sup>, Düsseldorf, Deutschland), bis hin zur Körnung 4000 poliert. Es folgten Desinfektion in

70%igem Alkohol (PMMA - Kunststoff und Komposit nur kurz wegen Oberflächenanlösung) und Reinigung im Ultraschallbad Bandelin Sonorex Super (Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland), Schmelz zusätzlich in Natriumhypochlorit 1% (Hedinger, Stuttgart, Deutschland). Bis zur Montage an den Trageschienen wurden die Proben in Aqua dest. (Aqua Spüllösung, Delta Select, Pfullingen, Deutschland) kühl aufbewahrt (Liebherr premium, Liebherr Hausgeräte, Ochsenhausen, Deutschland). Die Prüfkörper wurden mit PRESIDENT Plus light body Abformmasse (Coltène<sup>®</sup>, Schweiz) auf den Schienen befestigt. Nach der intraoralen Exposition wurden die Schienen abgespült, vorsichtig mit Luft getrocknet und die Prüfkörper abgehoben. Die Biofilme wurden mit je zwei Schaumstoffpellets 2 x 2 mm (VOCO, Cuxhaven, Deutschland) unter Zuhilfenahme einer zahnärztlichen und einer Teflonpinzette T519 (Plano, Wetzlar) abgewischt. Auf eines der Pellets wurde mittels der Eppendorf Reference Pipette 1 – 10 µl (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und ratiolab<sup>®</sup> Pipettenspitzen (Müller, Dreieich, Deutschland) 2%ige Natriumlaurylsulfat Lösung (Apotheke d. Unikliniken d. Saarlandes) gegeben. Die Pellets wurden anschließend in Mikrotubes (1,5 ml, 39 x 10 mm, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gesammelt. Bis zur Analyse wurden die Eppendorfcups in der Gefriertruhe (Heraeus Herafreeze HFC 286 Basic, Kendro, Hanau, Deutschland) tiefgefroren. Auf die gepoolten Probenschwämmchen wurde selbst hergestellter 2-fach Lämmli-Puffer (Med. Biochemie, Univ. d. Saarlandes, Homburg) pipettiert, sorgfältig durchmischt und fünf Minuten stehen gelassen. Anschließend wurden die Cups mit einer sterilen zahnärztlichen Sonde perforiert. Das Abzentrifugieren der Lösung erfolgte mit der Biofuge Primo (Kendro, Hanau, Deutschland). Zur Proteindenaturierung wurden die Lösungen im Julabo MWB (Julabo Labortechnik, Seelbach, Deutschland) Wasserkocher erhitzt und bis zur weiteren Verwendung wieder tiefgefroren. Zur gelelektrophoretischen Auftrennung wurden 15%ige High-Tris-Gele gegossen und zur Auspolymerisierung mindestens einen Tag im Kühlschrank aufbewahrt. Vor der Gelbeschickung wurden die zwanzig Poole für ein Gel und der Bench Mark<sup>™</sup> Proteinmarker (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) aufgetaut, zentrifugiert und mit Ausnahme des Markers nochmals im Eppendorf-Thermostat 5320 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für fünf Minuten bei 95°C gekocht. Das Kondensat im Eppendorfcup wurde mit der Eppendorf Centrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) abzentrifugiert und die Cups durchmischt. Nach dem Einspannen der Gele in die Elektrophoreseapparatur

(Eigenbau Med. Biochemie, Univ. d. Saarlandes, Homburg, Deutschland) und Zugabe von Laufpuffer, wurden die Proben mit einer Hamilton-Pipette (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz) in die Aussparungen der Sammelgele pipettiert. Die Elektrophorese wurde unter niedriger Stromstärke von 5 mA über Nacht durchgeführt, am Folgetag wurde die Stromstärke für ca. eine Stunde auf 44 mA erhöht. Anschließend folgten die Coomassiefärbung und Entfärbung, dann erst die Silberfärbung.

Zum Vergleich der Banden der Pellikelproben mit dem Bandenmuster des Vollspeichels wurden von jedem Probanden Speichelproben gesammelt. Von diesen wurden zunächst Proben aus purem Speichel mit 2-fach Lämmli-Puffer, anschließend ultrazentrifugierter Speichel mit 2-fach Lämmli-Puffer und letztlich TCA-gefällte Proben mit 2-fach Lämmli-Puffer versetzt, gekocht und auf einem Vergleichsgel aufgetrennt.

Die Gele wurden mit dem Durchlichtscanner Epson Expression 1680 Pro (Seiko Epson®, Japan) eingelesen und im PC abgespeichert. Zur Archivierung wurden die Gele in einem Trockenrahmen (Promega, Mannheim, Deutschland) in Schutzfolie (Pütz Folien, Taunusstein, Deutschland) eingespannt. Die anschließende Auswertung erfolgte mit Image Master Total Lab Software (Amersham, Upsala, Schweden).

### **3.3 Methodik**

#### **3.3.1 Herstellung der Prüfkörpertrageschienen**

Nach Abformen der Kiefer der Probanden mit einem Elastic – Alginat (Mat. 1) wurden diese nach zehnminütiger Lagerung im Desinfektionsbad (Mat. 2) mit vakuumangemischtem Superhartgips (Mat. 3) ausgegossen und mit Hartgips (Mat. 4) gesockelt.

Nach der Aushärtung und Modellbearbeitung wurden für alle Probanden zehn Prüfkörpertrageschienen in Form von Minioplastschienen im zahntechnischen Labor angefertigt.

Dazu wurden hartelastische, transparente Kunststofffolien mit 1 mm Stärke und 125 mm Durchmesser (Mat. 5) verwendet und im Tiefziehverfahren (Mat. 6) hergestellt (Abb. 1)

Im Seitenzahnbereich wurden die Schienen etwas über die Alveolarfortsätze ausgedehnt, um eine ausreichende Unterlage für die Prüfkörperfixierung zu gewinnen. Zur Verbesserung der Retention des Befestigungssilikons wurden diese Bereiche der Schienen perforiert.



Abb. 3: Tiefziehapparatur und Materialien zur Herstellung der Trageschienen

#### 3.3.2 Herstellung der Prüfkörper

##### **Goldprüfkörper**

Hierzu wurden handelsübliche hochgoldhaltige Dentalgoldplättchen (Mat. 7) im Originalzustand verwendet.

##### **Keramikprüfkörper**

Aus Resten von CEREC<sup>®</sup> Fräsblöcken (Mat. 8) wurden mit einer diamantierten Trennscheibe (Mat. 9) 7 x 7 mm messende Plättchen herausgeschnitten.

##### **Kunststoffprüfkörper**

Zunächst wurde aus kaltpolymerisierendem Prothesenkunststoff (Mat. 10) eine Platte nach Herstellerangaben gefertigt, aus der dann 7 x 7 mm große Plättchen geschnitten wurden.

#### **Teflonprüfkörper**

Hierzu wurden aus einer 2 mm starken Teflonplatte unbekanntem Herstellers (Mat. 11) 7 x 7 mm messende Plättchen gefertigt.

#### **Schmelzprüfkörper**

Aus extrahierten Schneidezähnen frisch geschlachteter Rinder (Mat. 12) wurden 7 x 7 mm große Stücke geschnitten. Die Lagerung bis zur Weiterverwendung erfolgte in Aqua dest. im Kühlschrank.

#### **Kompositprüfkörper**

Das Kompositmaterial (Mat. 13) wurde in Teflonschablonen (Mat. 11) auf einer Unterlage aus Universal Contour Strips (Mat. 14) eingebracht und 40 s lichtgehärtet (Mat. 15), im Anschluss wurden 7 x 7 mm Plättchen herausgeschnitten.

#### **Glasionomierzementprüfkörper**

Dazu wurde GIZ (Mat. 16) nach Herstellerangaben angemischt, auf einer Unterlage aus Tesafilm<sup>®</sup> (Mat. 17) mit aufgemaltem Raster appliziert und mit Universal Contour Strips abgedeckt. Nach der Initialhärtung wurde der Streifen entfernt und die Oberfläche mit lichtpolymerisierendem Bonding (Mat. 18) überdeckt und ausgehärtet. Anschließend wurden die Proben für 7 Tage bei 100% Luftfeuchtigkeit und 4°C im Kühlschrank (Mat. 19) gelagert.

Nach der Lagerung wurden 7 x 7 mm Plättchen geschnitten und erst kurz vor der Montage mit 4000er Nassschleifpapier poliert.

#### **Amalgamprüfkörper**

Das non –  $\gamma$  2 – Amalgam (Mat. 20) wurde gemäß den Herstellerangaben trituriert und in Teflonschablonen appliziert und kondensiert, nach der Initialhärtung wurde die Oberfläche brüniert. Nach 7 Tagen wurden 7 x 7 mm Plättchen daraus geschnitten.

#### **Glasprüfkörper**

Aus für die Mikroskopiertechnik üblichen Objektträgern (Mat. 21) wurden 7 x 7 mm Plättchen ausgeschnitten und poliert.

#### Titanprüfkörper

Dazu wurden von der Industrie zur Verfügung gestellte runde Titantestplättchen (Mat. 22), Ø 10 mm, verwendet.



Abb. 4: Polieren der Prüfkörper mit Nassschleifpapier

Alle Prüfkörper wurden in aufsteigender Reihe bis hin zur Körnung 4000 mit Nassschleifpapier poliert (Abb. 4), Glas direkt mit 4000er Papier, (Mat. 23 + 24) und die Oberflächenqualität im Auflichtmikroskop (Mat. 25) kontrolliert.



Abb. 5: Prüfkörper aus 10 verschiedenen Werkstoffen

v.l.n.r.: GIZ, Kunststoff, Teflon, Titan, Glas, Amalgam, Komposit, Gold, Schmelz, Keramik

#### 3.3.3 Vorbereitende Maßnahmen

Alle Prüfkörper (Abb. 5) und Schienen wurden zunächst und nach jedem Tragen im Ultraschallbad (Abb. 6) für 30 Minuten in 70%igem Alkohol (Mat. 26) desinfiziert (Kunststoff und Komposit nur für ca. 5 Minuten), anschließend mit Aqua dest. (Mat. 27) abgespült und für weitere 5 Minuten im Ultraschallbad (Mat. 28) in Aqua dest. gereinigt. Anschließend wurden die Prüfkörper zur Entfernung der vom Vorversuch evtl. verbliebenen Pellikelbasisschicht mit 4000er Nassschleifpapier poliert, und dann nochmals ca. 5 Minuten in Aqua dest. im Ultraschallbad gereinigt. Die Schmelzproben wurden zur Entfernung der Smearlayer statt in Aqua dest. in 1%igem Natriumhypochlorit (Mat. 29) im Ultraschallbad gereinigt und anschließend mit Aqua dest. abgespült.

Nach dem Reinigen wurden die Prüfkörper und Schienen für 24 Stunden in Aqua dest. im Kühlschrank gelagert.



Abb. 6: Ultraschallreinigung von Schienen und Prüfkörpern

Jeder Proband wurde angewiesen, 30 Minuten vor dem Tragedurchgang eine intensive Zahnreinigung durchzuführen. Dabei durften keine Detergentien wie Zahncreme oder Spüllösungen verwendet werden. Auch am Vortag waren Spüllösungen nicht erlaubt. Zulässige Hilfsmittel waren saubere Zahnbürste, Zahnseide und Interdentalbürsten. Nach der Reinigung wurde der Mund dreimal mit Wasser gründlich gespült. Ab diesem Zeitpunkt und während der oralen Expositionszeit der Schienen waren jegliche Nahrungsaufnahme, Trinken, Mundhygienemaßnahmen oder Sonstiges, wie z.B. Kaugummikauen, streng untersagt.

Unmittelbar vor Beginn des Tragedurchgangs wurden die jeweiligen am Vortag gereinigten Prüfkörper und Schienen aus dem Kühlschrank entnommen und zur Montage mit Luft vorsichtig getrocknet. Alle benötigten Materialien und Hilfsmittel wurden auf einem sauberen Papierhandtuch bereitgestellt. Zum Hantieren wurden Einmalhandschuhe (Mat. 30) getragen und für das Halten der Proben eine saubere Pinzette (Mat. 31) benutzt.

#### 3.3.4 Bestückungsplanung

Jeder der sechs Probanden hatte für jede der drei intraoralen Expositionszeiten (3 min, 30 min und 2 h) bei 10 Werkstoffen insgesamt 30 bestückte Schienen zu tragen. Es wurden jeweils 4 Prüfkörper im Oberkiefer regio 14 / 17 und 24 / 27 bukkal und palatinal montiert. Pro Tragedurchgang war so die Bestückung mit 16 Prüfkörpern des gleichen Werkstoffes möglich (Abb. 7).

Statt der ursprünglich geplanten rotierend wechselnden Montage der Prüfkörper mit vier sich wiederholenden Durchgängen wurden die Schienen einheitlich bestückt. Dadurch konnte die Menge gleichzeitig zu gewinnender Proteine verdoppelt und auf das Sammeln von 2880 Einzelproben, die dann später gepoolt würden, verzichtet werden. Außerdem wurden dadurch Interferenzen zwischen den werkstofflichen Materialeigenschaften der einzelnen Prüfkörper ausgeschlossen.

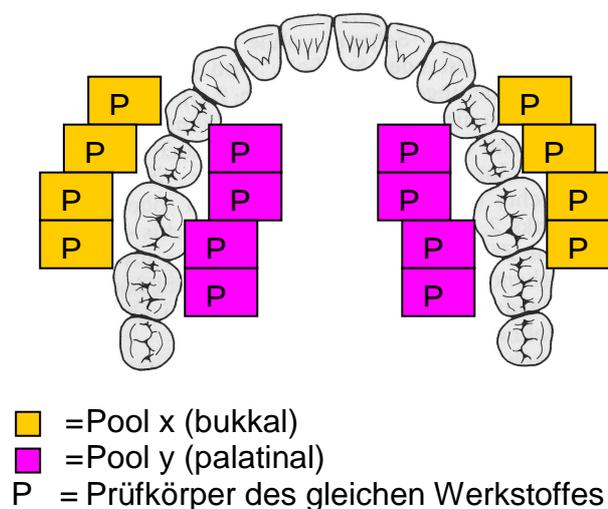


Abb. 7: Bestückungsplanung der Schienen

(Abb. aus: Lehmann / Hellwig, Einführung in die restaurative Zahnheilkunde, 8.Auflage, Urban & Schwarzenberg)

#### 3.3.5 Montage der Prüfkörper

Die getrockneten Schienen wurden auf die sauberen Modelle gesetzt, um ein Durchdrücken der Befestigungsabformmasse durch die Retentionslöcher auf die Innenseiten der Schienen zu vermeiden. Als Befestigungsmedium wurde ein niedrigvisköses Abformsilikon (Mat. 32) mit einer Mischpistole (Mat. 33) und jeweils frischen Mischkanülen (Mat. 34) verwendet.

Die Schienen wurden mit dem Silikon beschickt und anschließend die Prüfkörper gemäß den festgelegten Positionen mittels Pinzette vorsichtig auf der Abformmasse platziert und leicht in das Material eingedrückt. Eine Verschmutzung der Prüfkörper war unbedingt zu vermeiden (Abb. 8).

Nach dem Abbinden des Silikons wurden die Schienen von den Probanden vorsichtig eingesetzt und für den jeweiligen Zeitraum getragen.



Abb. 8: Trageschiene mit montierten Keramikprüfkörpern auf Modell und Silikonpistole

#### 3.3.6 Gewinnung der Pellikel

Nach Ablauf der Tragezeit wurden die Schienen wieder vorsichtig aus dem Mund entnommen, ein Berühren der Prüfkörper musste vermieden werden. Nach der Entnahme wurden die Schienen mit Aqua dest. Abgespült, um den verbliebenen Speichel sorgfältig zu entfernen und vorsichtig mit Luft der Multifunktionsspritze der Einheit (Mat. 35) getrocknet (Abb. 9).



Abb. 9: Schienenentnahme, Spülung und Lufttrocknung der Prüfkörper

Für die Pellikelgewinnung wurden die Prüfkörper von der Schiene entnommen und einzeln mit je 2 Schaumstoffpellets (Mat. 36) und Teflonpinzette (Mat. 37) intensiv mit stärkstem Anpressdruck abgewischt. Das erste Pellet wurde zunächst noch trocken verwendet, bevor mit einer Mikropipette (Mat. 38) und jeweils neuen Spitzen (Mat. 39) 2  $\mu$ l 2%ige Natriumlaurylsulfatlösung (SDS) (Mat. 40) zugegeben wurde. Das zweite Pellet wurde trocken verwendet, um die Restfeuchtigkeit von den Proben mit aufzunehmen (Abb. 10).

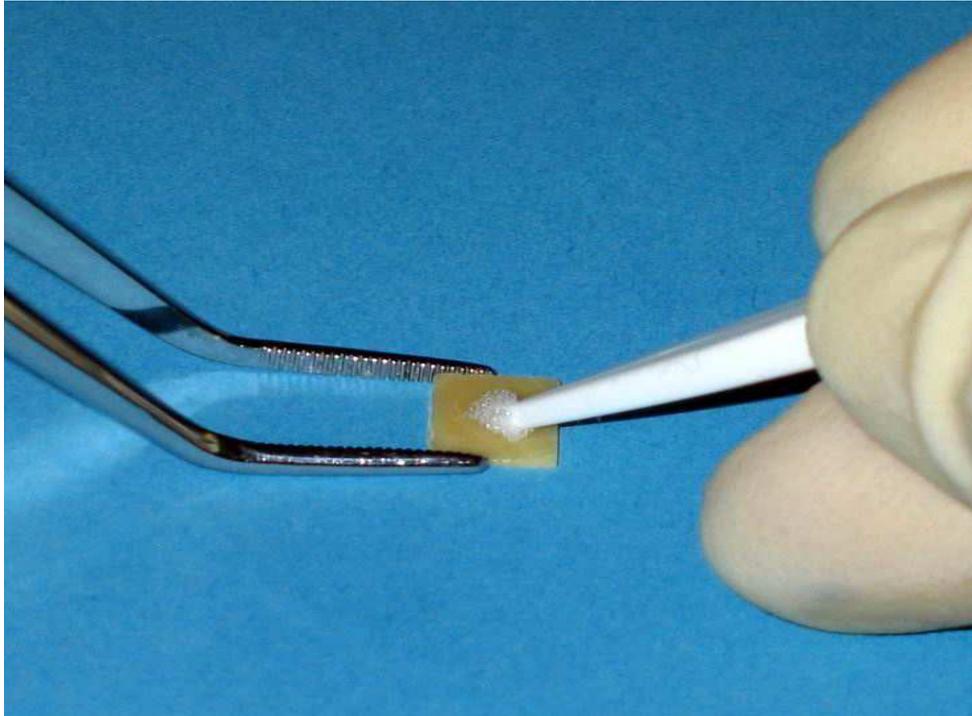


Abb. 10: Pellikelgewinnung von der Prüfkörperoberfläche mittels „Schwämmchenmethode“

Die 16 Pellets, die in einem Versuchsdurchgang durch das Abwischen der Substratoberflächen gewonnen worden waren, wurden in zuvor bereitgestellte und beschriftete Eppendorfcups (Mat. 41) gegeben. Um eine sichere Beschriftung zu gewährleisten, wurden die Cups mit Haftetiketten (Mat. 42) und zusätzlichem Klebestreifen (Mat. 17) versehen (Abb. 11).



Abb. 11: Materialien zur Pellikelgewinnung mittels „Schwämmchenmethode“

Die Cups wurden dicht verschlossen und bis zur weiteren Analyse bei  $-81^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren (Mat. 43) (Abb. 12).



Abb. 12: Gefriertruhe ( $-81^{\circ}\text{C}$ ) zum Lagern der Proteinproben

#### 3.3.7 Poolen

Um eine größere Proteinmenge für die elektrophoretische Separation zu erhalten, wurden die Schwämmchen von 8 Prüfkörpern gepoolt. Jede der 10 Prüfkörperarten eines Probanden der gleichen Lokalisation und Zeit ergab eine Poolgruppe, so dass  $8 \times 2 = 16$  Schwämmchen, entsprechend der Proteinmenge einer Oberfläche von  $8 \times 49 \text{ mm}^2 = 396 \text{ mm}^2$ , zur Verfügung standen, (bei Titanprüfkörpern  $8 \times 78,54 \text{ mm}^2 = 628,31 \text{ mm}^2$ ).

Aus den sonst 2880 anfallenden Einzelproben ergaben sich somit 360 Poolgruppen zur weiteren Analyse.

#### 3.3.8 Proteingewinnung

Die tiefgefrorenen Cups wurden aus der Gefriertruhe entnommen, langsam aufgetaut und mit dem Vortex (Abb. 15) durchmischt. Inzwischen wurde ein Wasserkocher (Mat. 44) auf 95°C vorgewärmt (Abb. 19). Mit der Mikropipette wurden 40 µl 2-fach-Lämmli-Puffer (Tabelle 4) (Mat. 45) auf die Schwämmchen gegeben und mit der Pipettenspitze durch Rühren durch alle Schwämmchen sorgfältig verteilt (Abb. 13 und 14).



Abb. 13: Aufpipettieren von Lämmli - Puffer

Tab. 4: Rezept zur Lämmli-Puffer-Herstellung

<b>Lämmli-Puffer-Stammlösung:</b>	2-fach
2M Tris pH 6,8	6 ml
10% SDS	40 ml
87% Glycerol	23 ml
ad Millipore H <sub>2</sub> O	90 ml
	davon
<b>Gebrauchslösung:</b>	9 ml +
β-Mercaptoethanol	1 ml
Bromphenolblau	2 Kristalle



Abb. 14: Vermischen der Pellets mit Lämmli-Puffer

Die Cups wurden dann wieder mit einem Rüttler (Mat. 46) durchmischt und ca. 5 Minuten stehen gelassen.



Abb. 15: Rüttler (Vortex)



Abb. 16: ineinander gestellte Cups vor Zentrifugation

Mit einer sterilen zahnärztlichen Sonde (Mat. 47) wurde die Unterseite der Cups perforiert und in ein weiteres gleichermaßen beschriftetes Cup gestellt (Abb. 16). Jetzt wurden die Cups gleichmäßig in den Rotor der Zentrifuge (Mat. 48) gestellt und mit einer Drehzahl von 14.000 U/min 5 Minuten zentrifugiert (Abb. 17).



Abb. 17: bestückter Zentrifugenrotor

Das untere Cup mit der abzentrifugierten Proteinlösung wurde dicht verschlossen. Dann wurden die Cups zur Proteindenaturierung in einem Ständer für 1,5 Minuten in den auf 95°C vorgeheizten Wasserkocher gestellt, der gerade soviel Wasser enthielt, dass der Ständer bis zu seinem Unterrand darin stand. Nach dem Abkühlen wurden die Proben bis zur gelelektrophoretischen Auftrennung wieder tiefgefroren.



Abb. 18: Zentrifugat



Abb. 19: Proteindenaturierung im Wasserbad

#### 3.3.9 Herstellung der Vollspeichelproben, TCA-Fällung

Zum Vergleich der Bandenmuster der Pellikelproben mit dem des Vollspeichels wurde von jedem Probanden eine Speichelprobe in einem Eppendorf-Cup gesammelt und bis zur weiteren Aufbereitung tiefgefroren.

Das Vergleichsgel wurde mit drei unterschiedlich aufbereiteten Speichelproben beschickt.

Zunächst wurden vom reinen vermischten Speichel jedes Probanden für Probe A 10  $\mu$ l entnommen und mit 10  $\mu$ l 2-fach-Lämmli vermischt und gekocht. Vom restlichen Speichel wurden 250  $\mu$ l in sterile gekühlte Beckmann-Cups (Mat. 49) pipettiert und in einem gekühlten TLA 100.3 Rotor (Mat. 50) für 30 Minuten bei 2°C und 50.000 U/min mit der Beckmann Coulter Optima™ Max-E 100.000 RPM (Mat. 51) ultrazentrifugiert (Abb. 20).



Abb. 20: Ultrazentrifuge Beckmann Coulter Optima™ Max-E

Vom klaren abpipettierten und wegen des evtl. Konzentrationsgefälles durchmischten Überstand wurden 10  $\mu$ l mit 10  $\mu$ l 2-fach-Lämmli-Puffer für Probe B vermischt und gekocht. 200  $\mu$ l (mind. 100  $\mu$ l) wurden in ein weiteres gekühltes steriles Eppendorf-Cup pipettiert. Zur Proteinfällung wurden 85,6  $\mu$ l 50% TCA (Mat. 52), gekühlt, zugegeben, durchmischt und bei 0°C 15 Minuten im ne olab® Eisbad 1-6031 (Mat. 53) aufbewahrt (Abb. 21).



Abb. 21: Eisbad zur Kühlung der Proben

Danach wurden die Proben für 15 Minuten bei 2°C und 14.000 U/min mit der Eppendorf Centrifuge 5402 (Mat. 54) zentrifugiert (Abb. 22).

Der Überstand wurde verworfen und auf das Pellet 500 µl Aceton (-20°C) (Mat. 55) gegeben, durchmischt und für 15 Minuten bei -20°C g elagert. Anschließend wurde wieder unter den gleichen Bedingungen, wie oben beschrieben, zentrifugiert und der Überstand verworfen.



Abb. 22: Eppendorf Kühlzentrifuge 5402

In der Con-1000-Evaporatorzentrifuge (Mat. 56) wurde in ca. 10 Minuten das überschüssige Aceton unter Vacuum abzentrifugiert (Abb. 23). (Aceton würde sonst in Verbindung mit Lämmli-Puffer das Austreten der Proben aus den Geltaschen bewirken.)



Abb. 23: Vakuumzentrifuge Con-1000

Für Probe C wurde das trockene Pellet in 20  $\mu$ l 1-fach-Lämmli-Puffer aufgenommen, durchmischt und bei 95°C 5 Minuten gekocht. Bei Grünfärbung der Proben (TCA-Reste) wurden diese vor dem Kochen mit 1  $\mu$ l 1M Tris HCL neutralisiert.

#### **3.4 High-Tris-Gelelektrophorese, Coomassie- und Silberfärbung**

Im Laufe der Erprobungsphase hat sich die Elektrophorese mit 15%igen High-Tris-Gelen als sehr effiziente, und dem PhastSystem® (Elektrophoresesystem von Amersham Pharmacia Biotech) überlegene Methode erwiesen. Hier war es möglich die 20 Proben einer Zeitspanne eines Probanden gleichzeitig auf einem Gel über eine große Distanz aufzutrennen.

#### 3.4.1 Gießen der 15%igen High-Tris-Gele

Vor dem eigentlichen Gießen eines Geles mussten ein Sockel mit Hohlfräsung (Mat. 57), eine rechteckige Glasplatte, eine ebensolche Glasplatte mit Aussparung (Mat. 58), 2 Spacer, 4 Klammern und ein 21er Kamm (Mat. 59, 60, 61) mit Ethanol gereinigt und zusammengebaut werden (Abb. 24). Auf der Vorderseite der Glasplatte mit der rechteckigen Aussparung wurde mit wasserfestem Stift eine Füllhöhenmarkierung angebracht, die der doppelten Kammhöhe entsprach. Gleichzeitig wurde die Platte mit Name und Gelart beschriftet.

Das dreiteilige Gel bestand aus einem Bodengel, dem eigentlichen Trenngel und dem Sammelgel.



Abb. 24: Formteile für den Guss der High-Tris-Gele

#### 3.4.1.1 Bodengel

Das Bodengel besteht aus 2%iger Agarlösung (Mat. 62). Das feste Gel wurde in der Mikrowelle (Mat. 63) 2 bis 3 Minuten erhitzt und 10 ml davon in die Ausfräsung des Sockels gegossen. Die mit Klammern fixierten und den Spacern auf Abstand gehaltenen Glasplatten wurden in diese Ausfräsung gestellt, das Agargel versiegelte den unteren Anteil des Plattenzwischenraums (Abb. 25).



Abb. 25: Materialien zum Guss des Bodengels

#### 3.4.1.2 Trenngel

Je nach Anzahl der zu gießenden Gele (Abb. 26) wurden unterschiedliche Mengen (Tab. 5) der folgenden Substanzen in ein Becherglas (Mat. 64) pipettiert (Mat. 38 + 39) und mittels Magnetrührer (Mat. 65 + 66) vermengt.

- Acrylamid 4 x 40% (Mat. 67)
- Bisacrylamid 2%, sterilfiltriert (N,N'- Methylene-bisacrylamide 2 x 2%) (Mat. 68)
- 1,875 M Tris pH 8,8 mit HCl (Tris(hydroxymethyl)aminomethan) (Mat. 69)
- Millipore H<sub>2</sub>O (Mat. 70)
- 10% SDS (Mat. 71)

Erst durch Zugabe der folgenden beiden Stoffe direkt aus dem Kühlschrank begann die Abbindereaktion des Gels, so dass ab jetzt zügig gearbeitet werden musste.

- TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin) (Mat. 72)
- 20% AMPS (Amoniumpersulfat) (Mat. 73)

Tab. 5: Rezept zur Herstellung der Trenngele

Substanz	1 Gel	2 Gele	3 Gele	4 Gele	5 Gele	6 Gele
40% Acrylamid ml	5,63	11,26	16,89	22,52	28,15	33,78
2% Bisacrylamid ml	1,5	3	4,5	6	7,5	9
Millipore-H <sub>2</sub> O ml	1,67	3,34	5,01	6,68	8,35	10,02
1,875M Tris pH 8,8 ml	6	12	18	24	30	36
10% SDS µl	150	300	450	600	750	900
TEMED µl	5	10	15	20	25	30
20% AMPS µl	45	90	135	180	225	270
ENDVOLUMEN ml	15	30	45	60	75	90



Abb. 26: Materialien zur Herstellung der Trenngel

Die Kämmen mussten vor dem Guss aus den Glasplatten entfernt sein, dann wurden die Gele mit ca. 1-2 mm Überschuss (wg. Polymerisationsschrumpfung) über die Füllhöhenmarkierung gegossen.

Um eine gleichmäßige und glatte Trennlinie zu erhalten, wurden die frisch gegossenen Trenngel ca. 3 mm hoch mit 500 µl Butanol (Mat. 74) überschichtet. Nach Einsetzen der Kämmen konnte nach ca. 15 Minuten eine dritte Linie erkannt werden. Das Butanol wurde abgeschüttet, und mit Filterpapierstreifen (Mat. 75) wurden die verbliebenen Reste vorsichtig ohne Gelkontakt abgesaugt.

#### 3.4.1.3 Sammelgel

Während der 15-minütigen Abbindezeit der Trenngele, konnten in ein weiteres Becherglas die Substanzen für die Sammelgele pipettiert werden. Auch hier wurden, je nach Anzahl der Sammelgele, die in Tabelle 6 ersichtlichen Mengen verwendet (Abb. 27).

- Acrylamid 4 x 40%
- Bisacrylamid 2%
- Millipore H<sub>2</sub>O
- 1M Tris pH 6,8 (Mat. 78)
- 10% SDS
- TEMED
- 20% AMPS

Tab. 6: Rezept zur Herstellung der Sammelgele

Substanz	1 Gel	2 Gele	3 Gele	4 Gele	5 Gele	6 Gele
40% Acrylamid ml	0,9	1,8	2,7	3,6	4,5	5,4
2% Bisacrylamid ml	0,24	0,48	0,72	0,96	1,2	1,44
Millipore-H <sub>2</sub> O ml	5,01	10,02	15,03	20,04	25,05	30,06
1M Tris pH 6,8 ml	0,9	1,8	2,7	3,6	4,5	5,4
10% SDS µl	72	144	216	288	360	432
TEMED µl	10,5	21	31,5	42	52,5	63
20% AMPS µl	67,5	135	202,5	270	337,5	405
ENDVOLUMEN ml	7,2	14,4	21,6	28,8	36	43,2

Die Abbindereaktion fand hier wesentlich schneller statt als beim Trenngel, so dass noch schneller gearbeitet werden musste. Die Kämme wurden vorher wieder entfernt, die Sammelgele zügig gegossen und die Kämme anschließend schnell wieder eingesetzt und mit zwei Klammern fixiert. Abschließend wurden die Gele mit Parafilm (Mat. 79) abgedeckt und mindestens eine Woche im Kühlschrank gelagert. Bei kürzerer Wartezeit kam es infolge der unvollständigen Polymerisation zu unsauberen Spurläufen.



Abb. 27: Materialien zur Herstellung der Sammelgele

#### 3.4.2 Vorbereitung und Elektrophorese

Die tiefgefrorenen Proben wurden aufgetaut, 20 Sekunden bei 14.000 U/min zentrifugiert (Mat. 80) und für 5 Minuten im Eppendorf-Thermostat (Mat. 81) bei 95°C gekocht. Das entstandene Kondensat wurde wieder abzentrifugiert, und die Proben wurden durchmischt (Abb. 28).



Abb. 28: Zentrifuge 5415C und Thermostat 5320

Eine Elektrophoreseapparatur (Mat. 82) wurde an den Stromgeber (Mat. 83) angeschlossen, das Gel aus dem Kühlschrank entnommen, Klammern, Parafilm und der Kamm vorsichtig entfernt. Jetzt wurde das Gel mit der Ausschnittsplatte nach hinten in Richtung der oberen Laufpufferkammer eingesetzt und wieder mit Klammern fixiert (Abb. 28).

Ein Liter 1-fach-konzentrierter Laufpuffer wurde durch Verdünnen von 5-fach-Laufpuffer (Tab. 7) (Mat. 84) (200 ml 5-fach + 800 ml Millipore H<sub>2</sub>O) hergestellt und in die obere und untere Kammer der Apparatur gefüllt. Die Laufpufferfüllhöhe sollte ca. 0,5 cm über den Taschen des Sammelgels und ebensoviel über der Agargrenze stehen.

Tab. 7: Rezept zur Herstellung des Laufpuffers

5-fach Laufpuffer	
Tris 50 mM	302,9 g
Glycin 384 mM	1441,4 g
SDS 0,1%	50 g
ad 10 Liter H <sub>2</sub> O bidestillata	

Mit einer Hamilton Microliter® Spritze (Mat. 85) wurden jeweils 26 µl Probenflüssigkeit in die Taschen appliziert (Abb. 29). In die erste Tasche kam 1 µl Bench-Marker™ (Mat. 86), danach folgte die übrige Probenapplikation nach

### 3. Probanden, Material und Methodik

---

festgelegtem Schema. Die Spitze der Pipettennadel wurde bis zum Taschenboden vorgeschoben und, während des Probenapplizierens in der Probenflüssigkeit verbleibend, langsam mit nach oben gezogen.

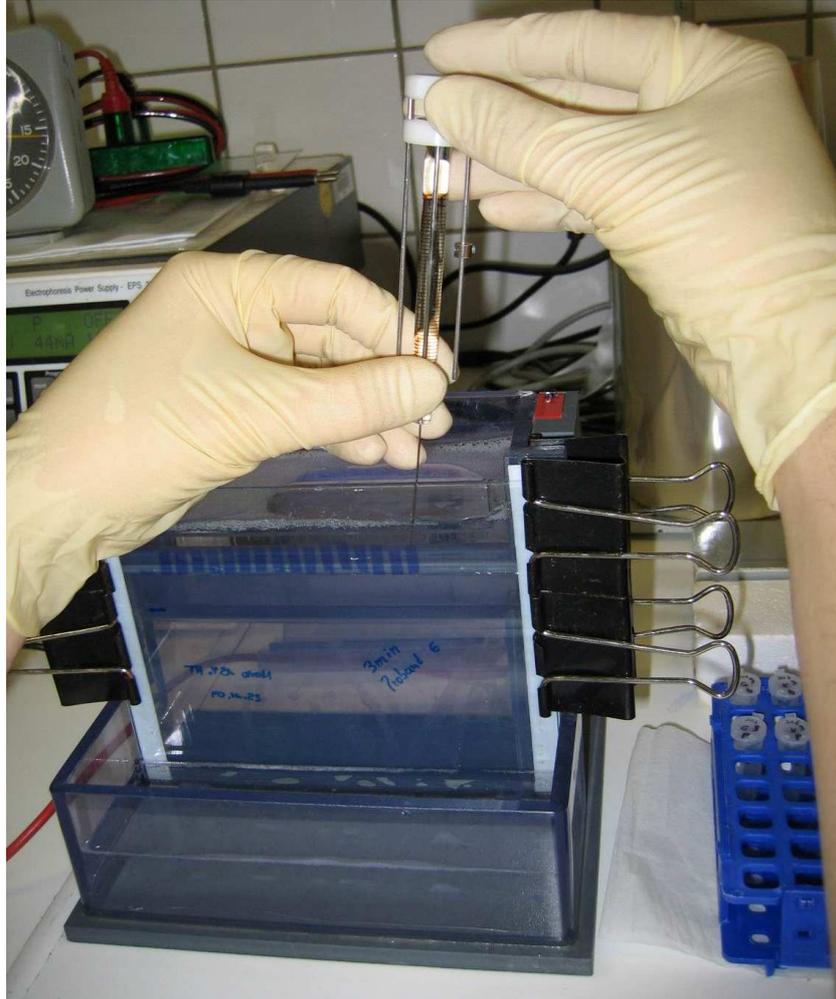


Abb. 29: Probenapplikation mittels Mikroliter-Syringe in die Geltaschen

Nach jeder Probenapplikation wurde die Pipette gründlich im unteren Laufpufferbecken durchgespült und auf Filterpapier abgetrocknet. Eine Proteinverschleppung oder Kontamination der übrigen Proben wäre laut durchgeführter Fremd-Tests angeblich nicht möglich.

Abschließend wurde der Deckel auf die Apparatur gesetzt und die Kontakte überprüft. Zur Sicherheit wurde der Deckel mit einer vollen Glasflasche beschwert.

Die Elektrophorese wurde über Nacht bei niedriger Stromstärke (5 mA) durchgeführt und morgens für ca. 1 Stunde auf 44 mA hochgestellt. (Der langsamere Nachlauf erbrachte bessere Auftrennungen).

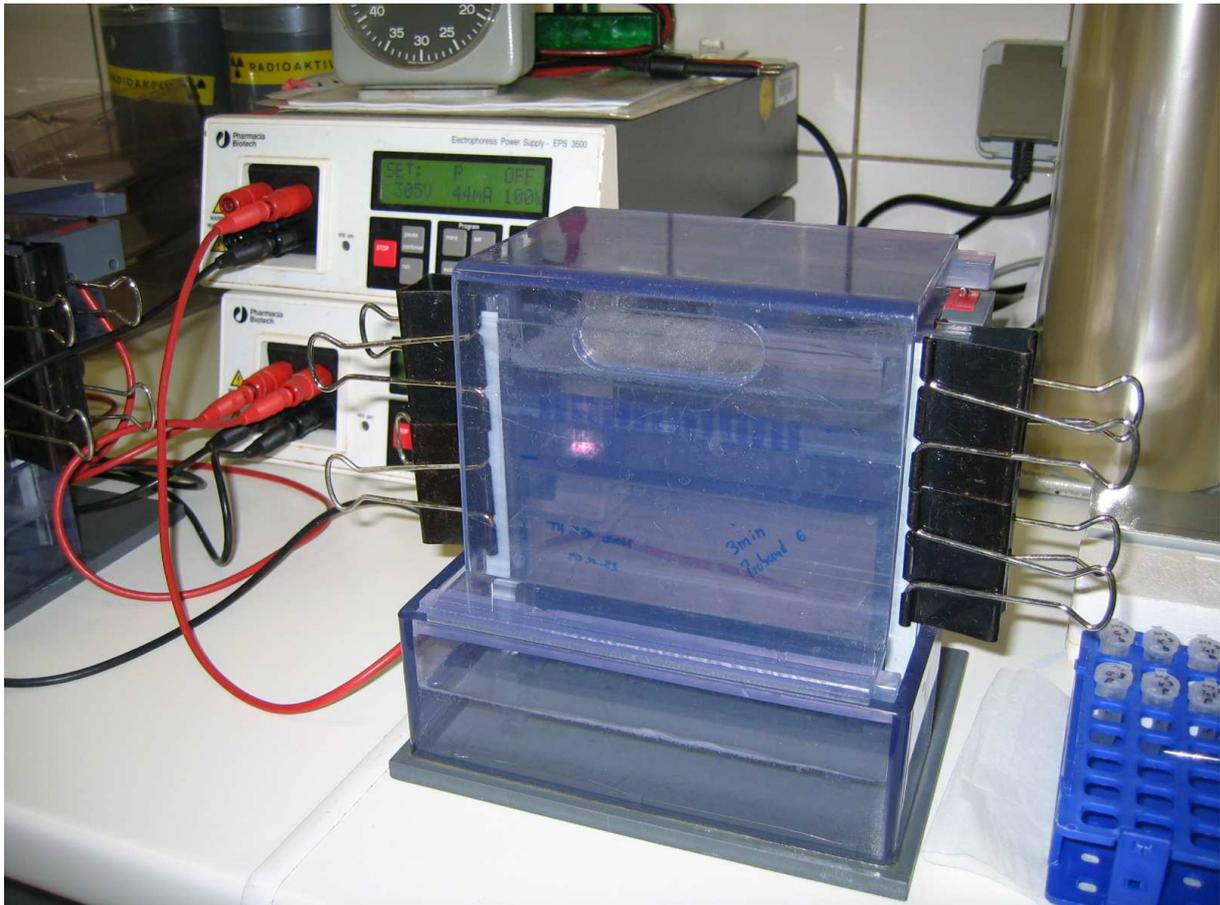


Abb. 30: Elektrophoreseapparatur mit High-Tris-Gel während der Separation

#### 3.4.3 Coomassiefärbung

Nachdem die Lauffront die Agargrenze erreicht hatte, wurde die Trennung gestoppt, das Gel aus der Apparatur entfernt und durch vorsichtiges Abhebeln der oberen Glasplatte und Entfernung von Boden- und Sammelgel isoliert. Zur Orientierung wurde links unten eine kleine Ecke des Geles abgetrennt. Das Gel konnte dann in eine Kunststoffwanne gelegt werden und mit Coomassiefärbelösung (Tab. 8) (Mat. 87) übergossen werden (Abb. 31).



Abb. 31: Coomassiefärbung

Nach ca. 30 Minuten auf dem Schüttelapparat (Abb. 32) (Mat. 88) wurde die Lösung abgossen und Entfärber I (Tab. 9) (Mat. 89) für 30 Minuten zugegeben, anschließend zweimal mit Millipore - H<sub>2</sub>O gespült und abschließend mit Entfärber II (Tab. 10) (Mat. 90) bis zum übernächsten Tag entfärbt, bis nur noch die schwach gefärbten Banden übrig blieben (Abb. 33 und 34).



Abb. 32: GFL Schüttelapparat mit den Gelen in Färbelösung

### 3. Probanden, Material und Methodik



Abb. 33: Aufbringen von Entfärber I



Abb. 34: Aufbringen von Entfärber II

Tab. 8: Rezept zur Herstellung von Coomassielösung

Coomassielösung	
0,2% Coomassie R250	1 g
0,005% Coomassie G250	0,025 g
40% Methanol	200 ml
H <sub>2</sub> O dest.	120 ml
10% Essigsäure	50 ml
ad 500 ml H <sub>2</sub> O bidest.	
über Nacht rühren lassen	
filtrieren	

Tab. 9: Rezept zur Herstellung von Entfärber I

Entfärber I	für 8 l
10% Eisessig technisch	800 ml
40% Methanol	3200 ml
H <sub>2</sub> O dest.	3840 ml
87% Glycerin 2%	180 ml

Tab. 10: Rezept zur Herstellung von Entfärber II

Entfärber II	für 8 l
5% Eisessig technisch	400 ml
10% Methanol	800 ml
H <sub>2</sub> O dest.	6620 ml
87% Glycerin 2%	180 ml

#### 3.4.4 Silberfärbung

Nach der Entfärbung wurde die Silberfärbung vorbereitet. 7 Lösungen waren dafür herzustellen (Tab. 11):

Tab. 11: Rezept zur Herstellung der Färbelösungen

Lösung		
2	Ethanol 99%	250 ml
	Essigsäure 99%	50 ml
	Millipore H <sub>2</sub> O	200 ml
4	Glutardialdehyd	150 ml
	Millipore H <sub>2</sub> O	300 ml
5	Millipore H <sub>2</sub> O	600 ml
6	Silbernitrat	2,5 g
	Millipore H <sub>2</sub> O	1000 ml
7	12,5% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	100 ml
	Millipore H <sub>2</sub> O	400 ml
	37% Formaldehyd	200 µl
8	Essigsäure 99%	25 ml
	Millipore H <sub>2</sub> O	475 ml
9	Essigsäure 99%	50 ml
	Glycerin 87%	28,7 ml
	Millipore H <sub>2</sub> O	421,3 ml

- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung: 62,5 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ad 500 ml Millipore H<sub>2</sub>O
- Ethanol 99% (Mat. 91)
- Essigsäure 99% (Mat. 92)
- Glutardialdehyd 25% (Mat. 93)
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 12,5% (Mat. 94)
- Silbernitrat (Mat. 95)
- Formaldehyd 37% (Mat. 96)
- Glycerin 87% (Mat. 97)

##### 3.4.4.1 Färbeprogramm

Auf einer Wippe (Abb. 35) (Mat. 98) konnten zwei Gele gleichzeitig gefärbt werden. Dazu wurden die Gele in den transparenten Kunststoffwannen zur besseren optischen Kontrastierung auf ein weißes Hintergrundpapier gestellt.

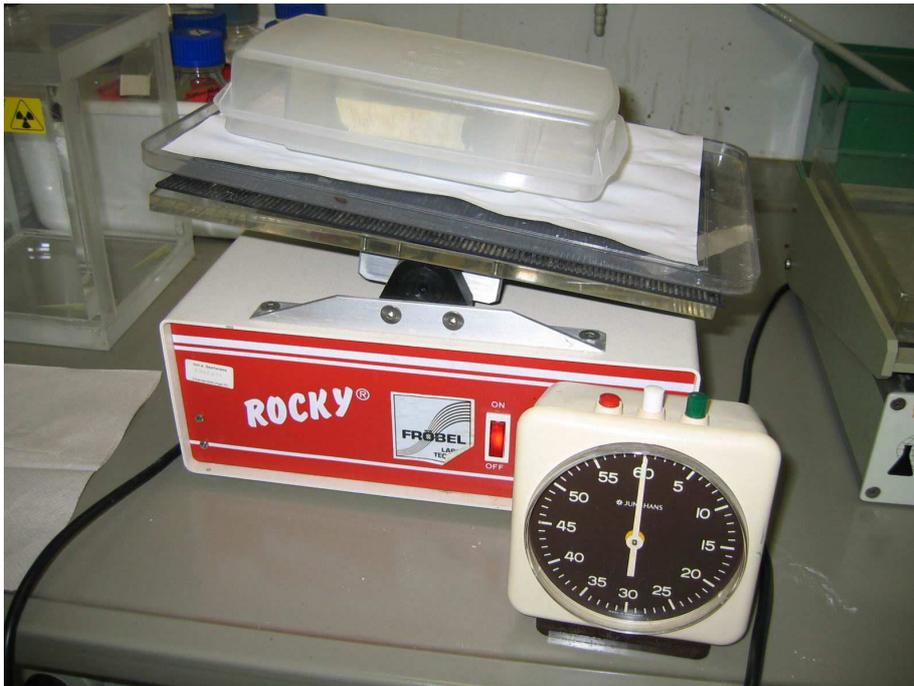


Abb. 35: Gelfärbung auf der Rocky® - Wippe

In Vorversuchen konnten die in Tabelle 12 ersichtlichen optimalen Einwirkzeiten der einzelnen Lösungen ermittelt werden.

Tab. 12: Einwirkzeiten der Färbelösungen

Lösung	Zeit
2	5 min
4	6 min
5	2 x 2 min
6	30 min
5	2 x 2 min
7	ca.15 min (optische Kontrolle)
8	2 min
9	ca. 10 min
Millipore H <sub>2</sub> O mit Glycerin	

#### 3.4.5 Archivierung

Nach dem Einscannen wurden die Gele für ca. eine halbe Stunde in Glycerin – Wasser - Lösung aufbewahrt und anschließend in vorher in Glycerin – Wasser - Lösung eingeweichte Cellophanfolie (Mat. 99) in einen Trockenrahmen (Mat. 100) für einen Tag eingespannt (Abb. 36).

### 3. Probanden, Material und Methodik

---

Nach dem Ausschneiden wurden sie nochmals für einen Tag unter einer Glasplatte gelagert und beschriftet.

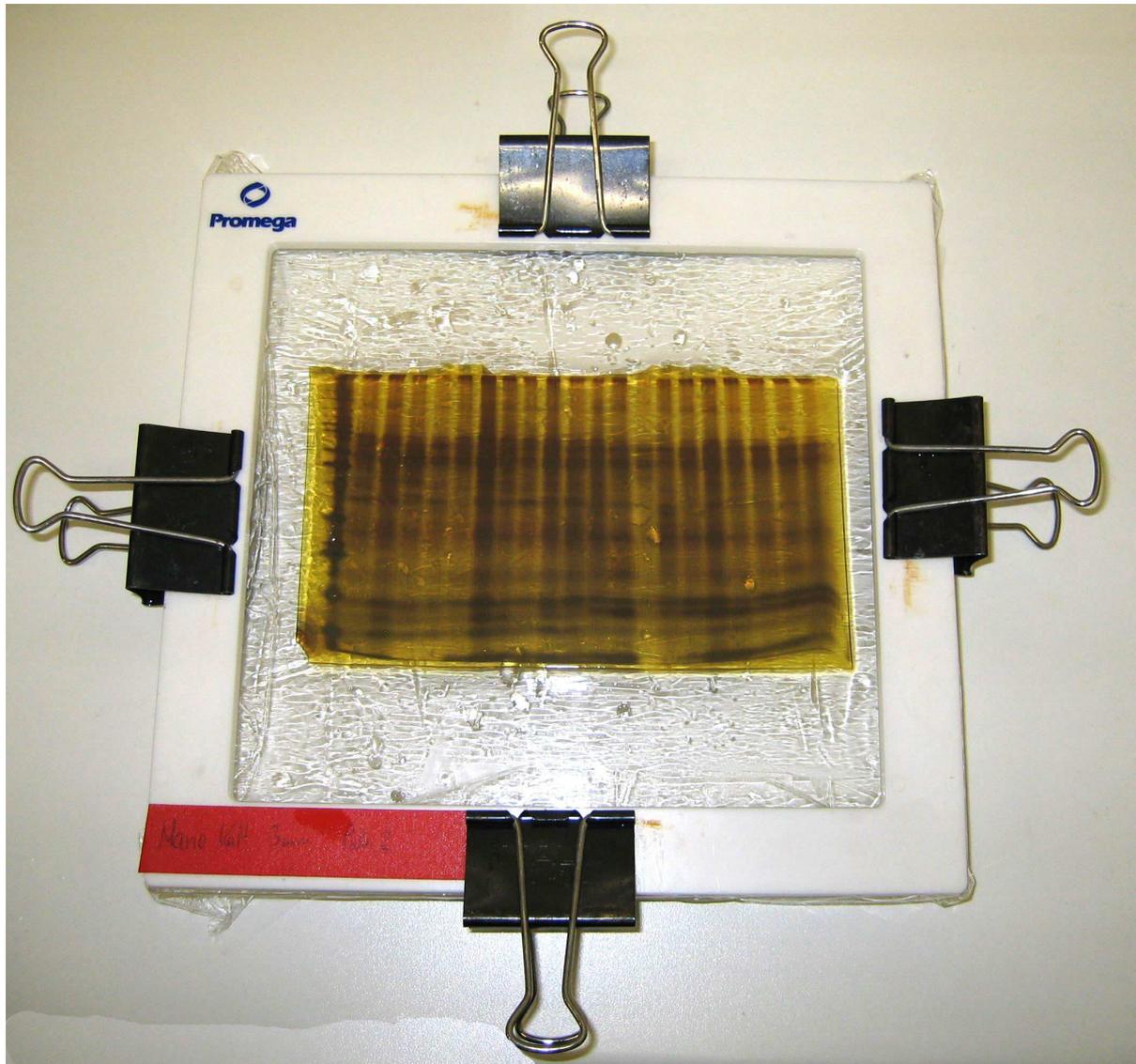


Abb. 36: Trockenrahmen mit eingespanntem Gel

#### 3.5 Auswertung

Die Gele wurden nach dem Färben noch im nassen Zustand mit etwas Flüssigkeit auf Ober- und Unterseite auf die Scheibe des Durchlichtscanners (Abb. 37) (Mat. 101) gelegt und mit einer transparenten Folie blasenfrei abgedeckt. Mit der LabScan-Software® 3.01 (Mat. 102) mit einer Auflösung von 300 dpi, 16 bit Graustufen und „Colour optimised for: Blue source“ wurden die Gele in den PC eingelesen und als nicht komprimierte TIFF - Dateien gespeichert.

### 3. Probanden, Material und Methodik

---

Mit diesen konnte die qualitative Analyse durchgeführt werden. Durch die unterschiedliche Affinität der einzelnen Proteine zu Silber kann mit der Silberfärbung keine quantitative Analyse der enthaltenen Proteinmenge anhand der Pixelintensität durchgeführt werden. Dazu ist eine Coomassie - Färbung nötig. Mit der ImageMaster™ 1D Elite Software (Mat. 103) konnten Anzahl und Molekulargewichte der einzelnen Banden anhand des Vergleichs mit dem Marker ermittelt werden.



Abb. 37: Durchlichtscanner zum Einlesen der Gele

### 3.6 Beispiel für die elektrophoretische Auftrennung von 3 min-Pellikelproben

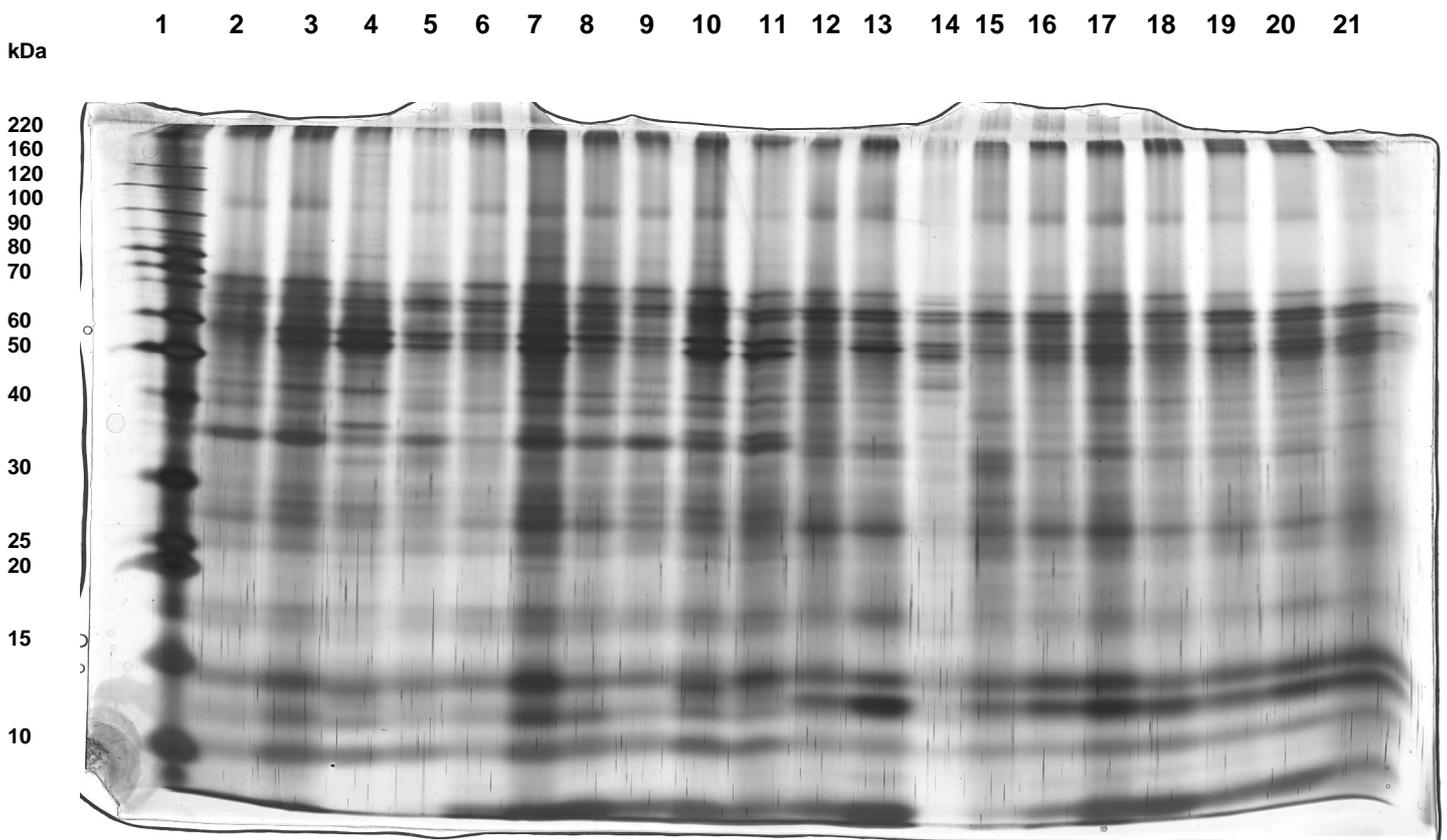


Abb. 38: Elektrophoretische Separation von 3 min-Pellikelproben

#### Legende (Laufspuren 1 bis 21):

- 1: Bench-Marker <sup>TM</sup> 10 bis 220 kDa
- 2: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Gold**prüfkörpern
- 3: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Keramik**prüfkörpern
- 4: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Teflon**prüfkörpern
- 5: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Kunststoff**prüfkörpern
- 6: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Schmelz**prüfkörpern
- 7: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Titan**prüfkörpern
- 8: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Glas**prüfkörpern
- 9: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Komposit**prüfkörpern
- 10: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Glasionomerzement**prüfkörpern
- 11: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Amalgam**prüfkörpern
- 12: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Gold**prüfkörpern
- 13: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Keramik**prüfkörpern
- 14: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Teflon**prüfkörpern
- 15: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Kunststoff**prüfkörpern
- 16: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Schmelz**prüfkörpern
- 17: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Titan**prüfkörpern
- 18: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Glas**prüfkörpern
- 19: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Komposit**prüfkörpern
- 20: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Glasionomerzement**prüfkörpern
- 21: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Amalgam**prüfkörpern

#### **3.7 Statistische Analyse**

Die horizontalen Verlaufsebenen der Banden im Gel waren nicht geradlinig sondern kurvig und geschwungen. Man bezeichnet diese Erscheinung auch als „smile“ oder „Grimasse“.

Die Software bot die Möglichkeit, in gewissen Grenzen diesen Effekt auszugleichen, jedoch resultierten in den Messwerttabellen für gleiche Banden innerhalb der verschiedenen Spuren des Geles unterschiedliche Zahlenwerte. Ein direkter Vergleich oder eine sinnvolle Analyse der vorhandenen oder fehlenden Banden war somit nicht möglich!

Um dennoch eine Auswertung des sehr umfangreichen Datenmaterials durchführen zu können, wurden zur statistischen Analyse die einzelnen Spuren der Gele in Intervalle eingeteilt, die den Markerabständen entsprachen. Es ergaben sich somit für jede Spur 15 Intervalle. Alle Banden innerhalb eines Intervalls wurden gezählt, und die sich daraus ergebende Anzahl für die weiteren Berechnungen benutzt.

Bei der statistischen Analyse wurde zur Ermittlung der Unterschiede zwischen den Mittelwerten jeweils zweier Gruppen der t - Test durchgeführt. Mit dem Scheffé – Test wurden die Mittelwerte der Gruppen untereinander verglichen. Die Varianzanalyse erfolgte mittels ANOVA und MANOVA.

### 4. Ergebnisse

In der vorliegenden klinisch-experimentellen *In-vivo*-Studie wurden von 6 Probanden 10 verschiedene Werkstoffe über Zeiträume von 3 -, 30 - und 120 Minuten an 2 verschiedenen Lokalisationen intraoral getragen. Nach Gewinnung der *in vivo* gebildeten Pellikel standen 360 gepoolte Einzelproben zur weiteren Analyse bereit.

#### 4.1 Gelelektrophoretisches Bandenmuster der Pellikelproben

Die 18 High-Tris-Gele (3 für jeden Probanden) zeigten nach abgeschlossener Silberfärbung alle eine hohe Anzahl (bis zu max. 65 je Laufspur) von Banden unterschiedlichster Dicke und Farbintensität. Auffallend dicke Banden zeigten sich vor allem im Bereich von 0 bis 20 kDa, vereinzelt auch im Intervall von 30 bis 40 kDa. Sehr dünne bis filigrane Banden zeigten sich jeweils in den Intervallen von 80 bis 220 kDa. Diese waren bei den palatinalen Proben stets schwächer gefärbt als bei den bukkalen. Zwischen 15 und 80 kDa stellten sich die meisten Banden in mittlerer Dicke dar. Die übrigen Banden der palatinalen Proben waren häufig weniger intensiv gefärbt als die der bukkalen Lokalisation.

Die Banden der Pellikelproben von Titan, Kunststoff und Amalgam fielen bei den meisten Gelen als stärker gefärbt auf, wohingegen Werkstoffe wie Teflon, Schmelz und auch Glas oft nur als schwach gefärbte Banden in Erscheinung traten.

Im Fall von Teflon und Schmelz, gelegentlich auch bei Glas, fielen besonders bei den palatinalen Proben extrem schwach gefärbte oder auch fehlende Banden im Molekulargewichtsbereich von 0 bis 15 kDa auf.

Im Bereich zwischen 25 und 80 kDa zeigten sich bei allen Gelen die geringsten Veränderungen und Unterschiede hinsichtlich Anzahl und Färbung der Proteinbanden. In diesem Bereich befanden sich die meisten Banden in kürzesten Abständen. Nur vereinzelt erschienen einzelne Banden bei unterschiedlichen Probanden und verschiedenen Werkstoffen intensiver gefärbt oder traten als besonders dicke Bande in Erscheinung.

Drei typische Gele von 3 -, 30 - und 120-Minuten-Pellikelproben zeigen stellvertretend für alle im Anhang 2 der Arbeit dargestellten Versuchsgel die aufgetrennten Proteinbanden (Abb. 39 – 41).

## 4. Ergebnisse

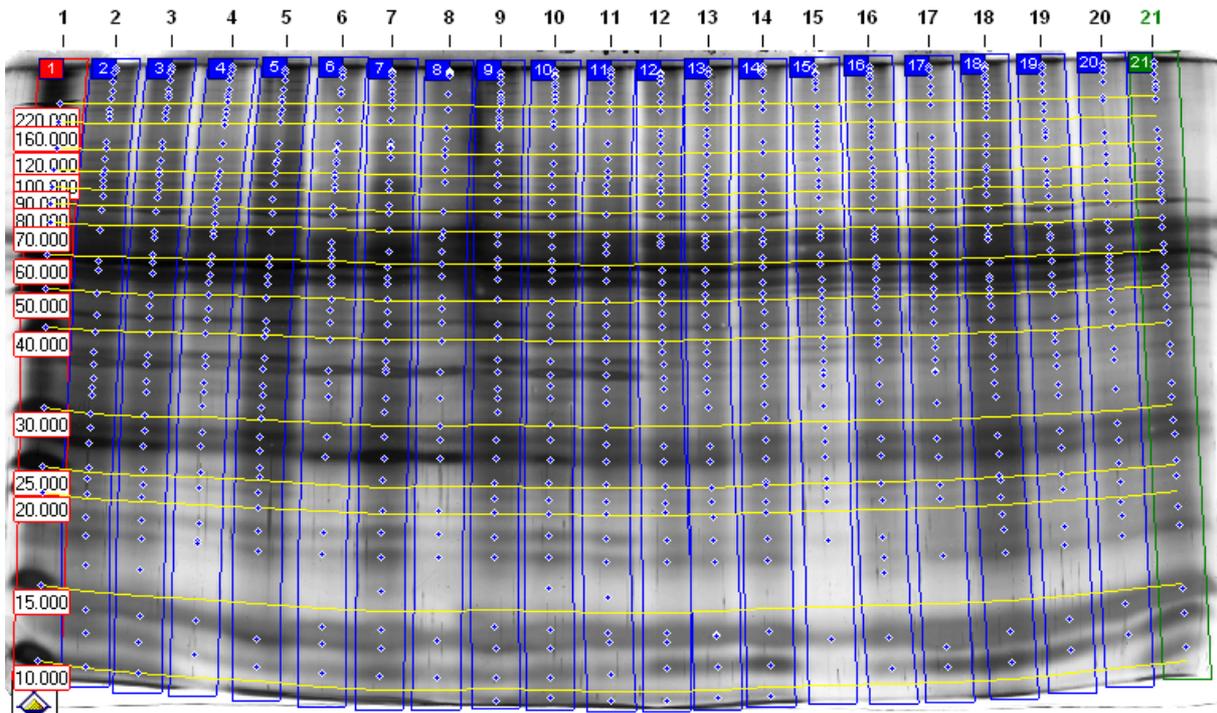


Abb. 39: Elektrophoretische Separation von **3 min**-Pellikelproben

### Legende (Laufspuren 1 bis 21):

- 1: Bench-Marker <sup>TM</sup> 10 bis 220 kDa
- 2: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Gold**prüfkörpern
- 3: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Keramik**prüfkörpern
- 4: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Teflon**prüfkörpern
- 5: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Kunststoff**prüfkörpern
- 6: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Schmelz**prüfkörpern
- 7: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Titan**prüfkörpern
- 8: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Glas**prüfkörpern
- 9: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Komposit**prüfkörpern
- 10: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Glasionomerzement**prüfkörpern
- 11: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Amalgam**prüfkörpern
- 12: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Gold**prüfkörpern
- 13: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Keramik**prüfkörpern
- 14: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Teflon**prüfkörpern
- 15: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Kunststoff**prüfkörpern
- 16: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Schmelz**prüfkörpern
- 17: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Titan**prüfkörpern
- 18: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Glas**prüfkörpern
- 19: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Komposit**prüfkörpern
- 20: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Glasionomerzement**prüfkörpern
- 21: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Amalgam**prüfkörpern

## 4. Ergebnisse

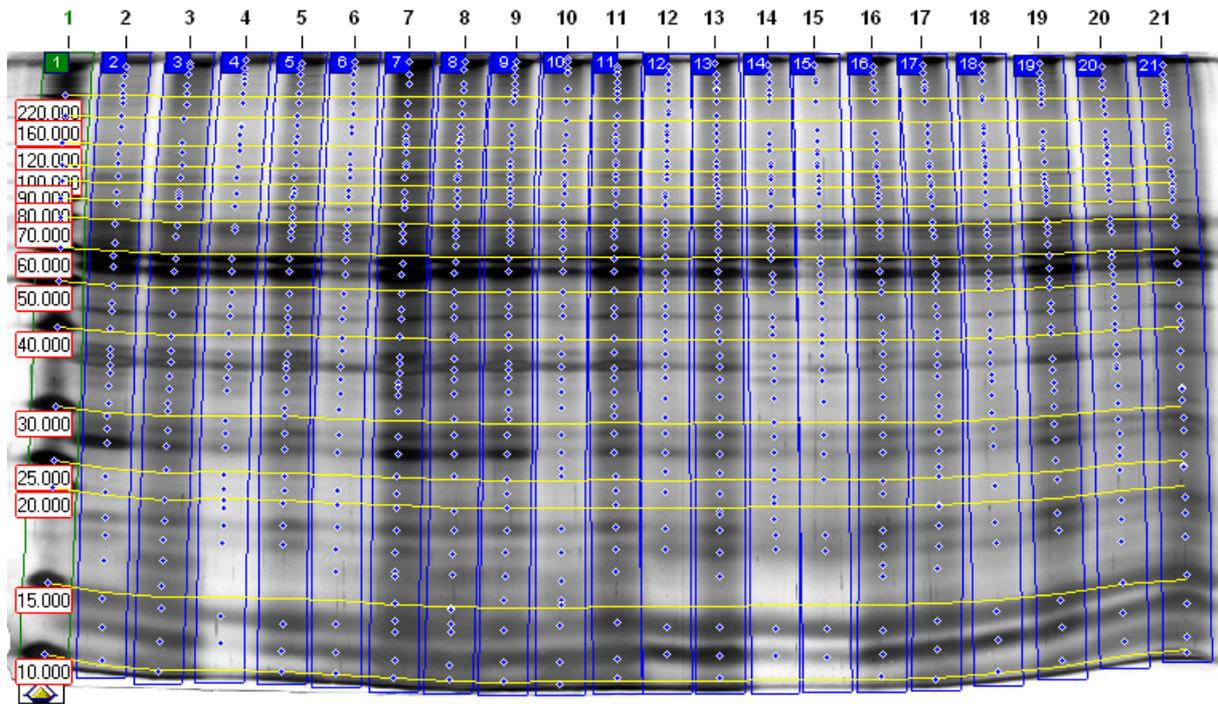


Abb. 40: Elektrophoretische Separation von **30 min**-Pellikelproben

### Legende (Laufspuren 1 bis 21):

- 1: Bench-Marker™ 10 bis 220 kDa
- 2: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Gold**prüfkörpern
- 3: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Keramik**prüfkörpern
- 4: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Teflon**prüfkörpern
- 5: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Kunststoff**prüfkörpern
- 6: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Schmelz**prüfkörpern
- 7: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Titan**prüfkörpern
- 8: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Glas**prüfkörpern
- 9: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Komposit**prüfkörpern
- 10: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Glasionomerzement**prüfkörpern
- 11: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Amalgam**prüfkörpern
- 12: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Gold**prüfkörpern
- 13: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Keramik**prüfkörpern
- 14: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Teflon**prüfkörpern
- 15: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Kunststoff**prüfkörpern
- 16: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Schmelz**prüfkörpern
- 17: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Titan**prüfkörpern
- 18: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Glas**prüfkörpern
- 19: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Komposit**prüfkörpern
- 20: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Glasionomerzement**prüfkörpern
- 21: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Amalgam**prüfkörpern

## 4. Ergebnisse

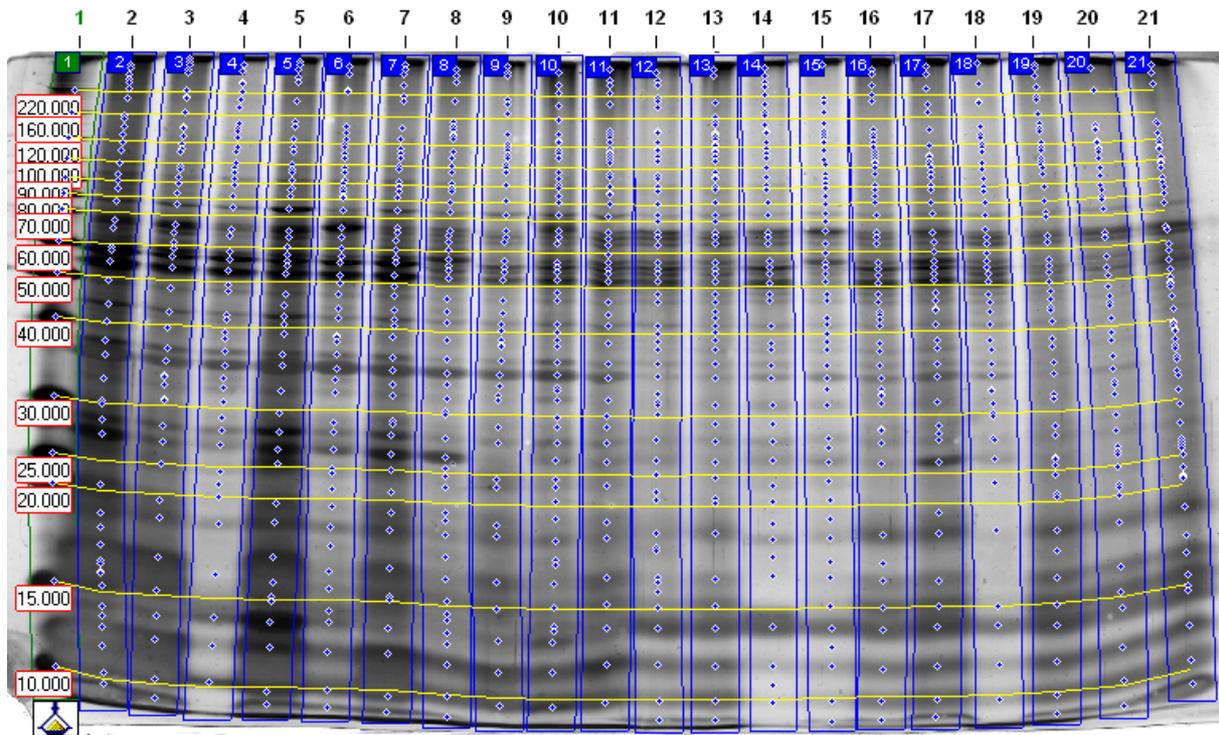


Abb. 41: Elektrophoretische Separation von **120 min**-Pellikelproben

### Legende (Laufspuren 1 bis 21):

- 1: Bench-Marker <sup>TM</sup> 10 bis 220 kDa
- 2: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Gold**prüfkörpern
- 3: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Keramik**prüfkörpern
- 4: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Teflon**prüfkörpern
- 5: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Kunststoff**prüfkörpern
- 6: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Schmelz**prüfkörpern
- 7: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Titan**prüfkörpern
- 8: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Glas**prüfkörpern
- 9: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Komposit**prüfkörpern
- 10: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Glasionomerzement**prüfkörpern
- 11: Bandenmuster der Pellikelproben von bukkal getragenen **Amalgam**prüfkörpern
- 12: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Gold**prüfkörpern
- 13: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Keramik**prüfkörpern
- 14: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Teflon**prüfkörpern
- 15: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Kunststoff**prüfkörpern
- 16: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Schmelz**prüfkörpern
- 17: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Titan**prüfkörpern
- 18: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Glas**prüfkörpern
- 19: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Komposit**prüfkörpern
- 20: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Glasionomerzement**prüfkörpern
- 21: Bandenmuster der Pellikelproben von palatinal getragenen **Amalgam**prüfkörpern

#### 4. Ergebnisse

---

Bei der Betrachtung der Gele konnte in Abhängigkeit von den 3 intraoralen Expositionszeiten kein Unterschied in Bezug auf die Bandenanzahl oder generelle Veränderungen von Bandendicke oder -färbung festgestellt werden.

Im Bereich der Probeneinlaufzone oberhalb von 220 kDa waren bei allen Gelen evtl. noch weiter auftrennbare Banden zu erkennen. Ebenso ließ sich dies im Auslaufbereich unterhalb der 10 kDa vermuten.

Bei der Betrachtung einzelner Gele gelangte man zum Eindruck, dass es werkstoffabhängige Unterschiede geben müsste, jedoch unter Einbeziehung aller Gele relativierte sich dies rasch wieder, denn vermeintliche Unterschiede im einen Gel wurden im nächsten Gel widerlegt. Dies bestätigte sich auch in der statistischen Analyse (siehe S. 124 ff).

Die unterschiedlichen Bandendicken und die starken Färbungsvarianzen lassen evtl. auf unterschiedliche Mengen der jeweils adsorbierten Proteine schließen, jedoch war auch hier keine allgemeingültige Aussage möglich, da diese Erscheinungen bei jeweils unterschiedlichen Zeiten, Probanden, Lokalisationen und Werkstoffen auftraten.

Dass auf den palatinal getragenen Prüfkörpern insgesamt weniger an Proteinmenge zu gewinnen war, was damit auch den schwächeren Färbungsgrad erklärte, zeigen nachfolgend auch eindrucksvoll die im Vorfeld der Versuche angefertigten transmissionselektronenmikroskopischen Bilder von *in vivo* gebildeten Pellikeln auf Rinderschmelzproben an den verschiedenen Lokalisationen, zu den 3 Zeiten und von allen Probanden (Abb. 42 und 43, siehe auch TEM – Bilder im Anhang 6).

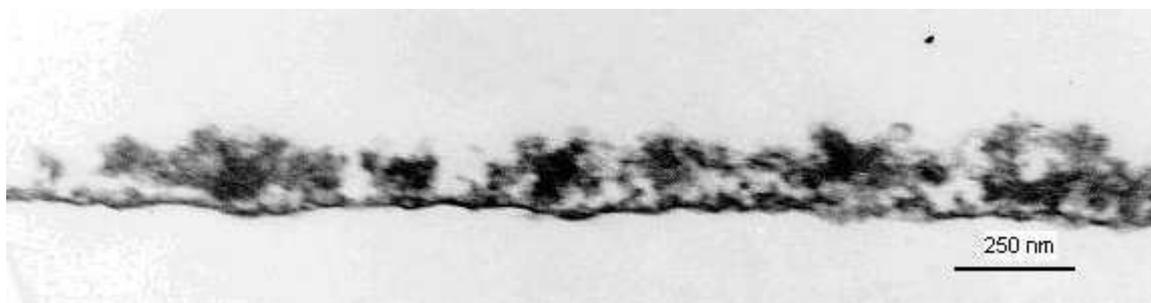


Abb. 42: TEM-Bild einer 120 min-Pellikel aus dem Oberkiefer Seitenzahngebiet **bukkal**, Proband 1

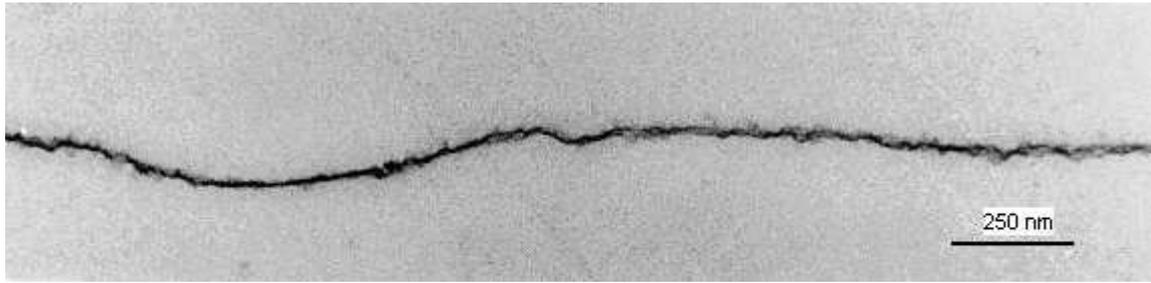


Abb. 43: TEM-Bild einer 120 min-Pellikel aus dem Oberkiefer Seitenzahngebiet **palatinal**, Proband 1

Bei genauer Betrachtung im Durchlicht und bei Vergrößerung ließen sich im Bereich der scheinbar fehlenden Banden doch meist noch zarte Banden erkennen, die auch von der Analysesoftware als solche detektiert wurden.

Tendenziell konnte aber ein gehäuftes „Fehlen“ bzw. eine schwächere Ausprägung der Banden im Bereich von 0 bis 10 kDa bei den Werkstoffen Teflon, Schmelz und Glas beobachtet werden. Dies war auffallender bei den palatinalen Proben als bei den bukkalen.

Im Bereich zwischen 30 und 40 kDa traten bei der auf Teflon gebildeten Pellikel im Vergleich zur Pellikel auf den übrigen Werkstoffen besonders dicke und intensiv gefärbte Banden in Erscheinung. Dies zeigte sich umso deutlicher bei den palatinalen Proben, wo ein besonderer Kontrast zu den sonst eher schwach gefärbten Banden bestand.

### 4.2 Gelelektrophoretisches Bandenmuster der Speichelproben

Von allen 6 Probanden wurden Vollspeichelproben mit den zwangsläufig darin enthaltenen Verunreinigungen durch Bakterien, Epithelzellen u.ä. gesammelt. Von diesen Proben wurde ein Teil nur mit Zusatz von 2-fach Lämmli-Puffer gelelektrophoretisch analog zu den Pellikelproben aufgetrennt. Das im Lämmli-Puffer enthaltene SDS löst Membranen auf und denaturiert Proteine, so dass auch die darin enthaltenen Proteine und Denaturierungsprodukte sich in der Probenlösung befanden. Im Gel zeigte sich praktisch das gleiche Bandenmuster, mit kleineren probandenspezifischen Unterschieden bezüglich Anzahl, Dicke und Färbungsintensität der einzelnen Banden, wie bei den Pellikelproben, generell jedoch ein recht einheitliches Bild (Abb. 44).

#### 4. Ergebnisse

---

Daneben wurden Proben eines ultrazentrifugierten Anteils der Ursprungsspeichelproben auch wiederum mit 2-fach Lämmli-Puffer aufgetragen. Bei der Ultrazentrifugation setzen sich alle festen und größeren Bestandteile und Verunreinigungen am Boden der Cups ab, nur der klare Überstand wurde weiterverwendet, so dass eine von Bakterien, Epithelzellen u.ä. befreite Lösung zur Verfügung stand. Eine Verunreinigung durch „Nichtspeichelproteine“ infolge der enzymatischen Aktivitäten im nativen Speichel und Membran- bzw. Zellbeschädigungen infolge der Zentrifugation ist weiterhin anzunehmen.

Diese Spuren zeichneten sich durch eine stark abgeschwächte Färbungsintensität aus. Es wurden weniger Banden festgestellt, v.a. im Bereich unterhalb 15 kDa.

Die 10 kDa-Banden schienen komplett zu fehlen.

Die Bereiche oberhalb 70 kDa waren deutlich schwächer gefärbt und enthielten weniger Banden, ebenso unterhalb 60 kDa. Die Banden im Intervall zwischen 70 und 80 kDa erschienen dagegen intensiver gefärbt und mehr Banden zu enthalten.

In einem dritten Schritt wurden jeweils bei einem Anteil der ultrazentrifugierten Proben eine TCA-Proteinfällung vorgenommen. In der sogenannten Fällung waren dann tatsächlich nur noch und auch wirklich alle Proteine der vorherigen Speichelproben enthalten.

Hier zeigte sich eine deutliche Intensivierung des Bandenmusters durch die hohe Proteinaufkonzentrierung (siehe Abb. 44).

Deutlich imponierten die 15 -, 25 -, 50 - bis 70 -, 80 - und 120 kDa-Banden.

Die 10 kDa-Banden traten nun wieder in Erscheinung, was ein Indiz dafür zu sein schien, dass sie in den vorherigen Spuren nicht gänzlich fehlten, sondern nur in sehr schwacher Ausprägung vorlagen.

Die Bandenanzahl im oberen Bereich von 70 bis 220 kDa nahm gegenüber den Ursprungsproben weiter ab, was aber durch die intensivere Färbung eher den gegenteiligen Effekt vortäuschte.

Diese Versuchsreihe zeigte, dass das gesamte Spektrum der im Vollspeichel enthaltenen Proteine auf den Werkstoffoberflächen adsorbiert wird.

Eine detaillierte Analyse einzelner oder bestimmter fehlender Banden, und damit von Proteinen, war, wie auch schon bei den Pellikelproben, nicht möglich. Es konnten nur tendenzielle, richtungsweisende Aussagen getroffen werden.

## 4. Ergebnisse

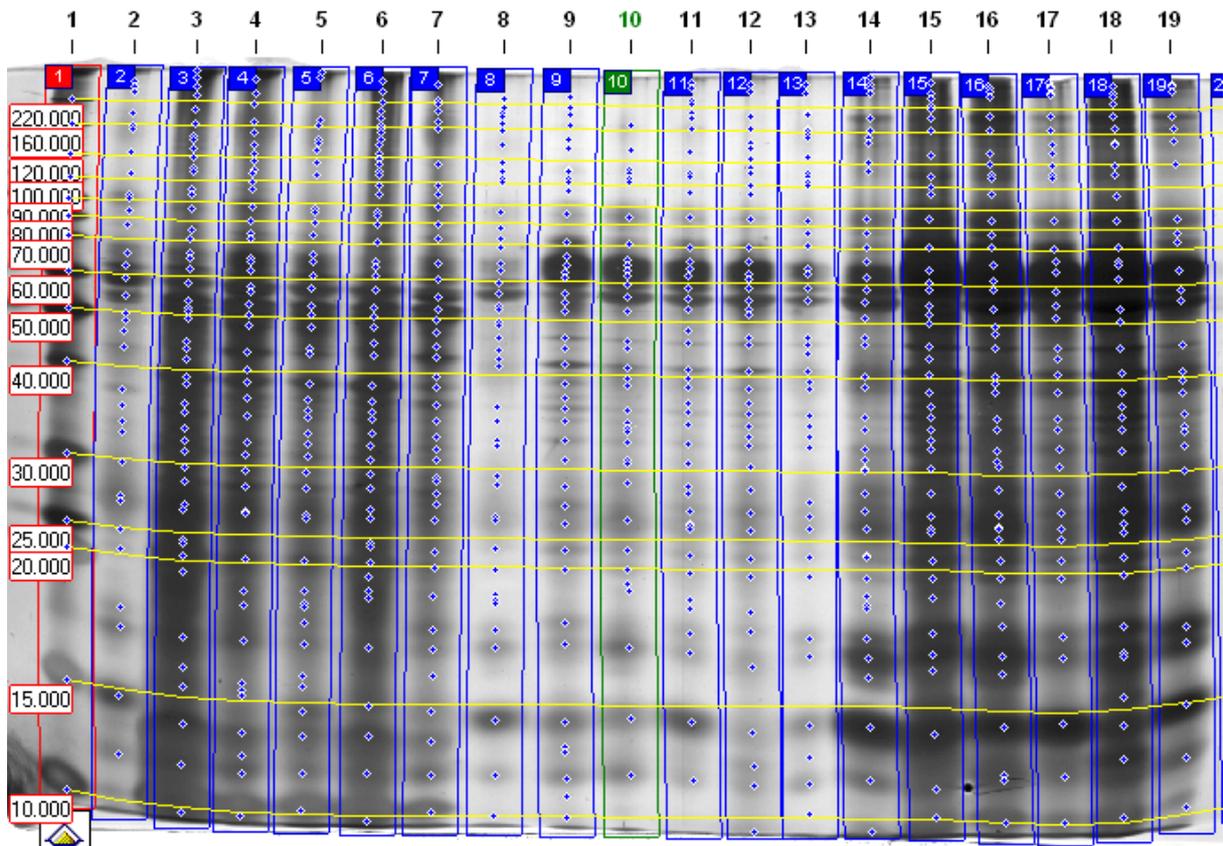


Abb. 44: Elektrophoretische Separation von Speichelproben aller Probanden in unterschiedlicher Aufbereitung mittels 15%igem High-Tris-Gel, **Silberfärbung** nach vorheriger Coomassiefärbung

### Legende:

- 1: **Bench-Marker™ (10 bis 220 kDa)**
- 2 – 7: **Vollspeichel der Probanden 1 bis 6, pur mit 2-fach Lämmli-Puffer**
- 8 – 13: **Vollspeichel ultrazentrifugiert mit 2-fach Lämmli-Puffer**
- 14 – 19: **Vollspeichel ultrazentrifugiert, TCA-Fällung mit 2-fach Lämmli-Puffer**

Die nachfolgende weitergehende Analyse wurde anhand der detektierten Bandenanzahlen innerhalb der 16 Markerintervalle (<10 kDa, 10 – 15 kDa, 15 – 20 kDa, 20 – 25 kDa, 25 – 30 kDa, 30 – 40 kDa, 40 – 50 kDa, 50 – 60 kDa, 70 – 80 kDa, 80 – 90 kDa, 90 – 100 kDa, 100 – 120 kDa, 120 – 160 kDa, 160 – 220 kDa und >220 kDa) durchgeführt.

Die auffälligen Dicken- und Färbungsunterschiede der einzelnen Banden lassen auf einen Unterschied in der darin enthaltenen Proteinmenge schließen. Eine Analyse der Proteinmengen der einzelnen Banden ausgehend von der Pixelintensität ist aber mit der Silberfärbung aufgrund der unterschiedlichen Affinitäten der Proteine zum Silber nicht möglich. Eine solche Analyse gelingt nur mit der Coomassiefärbung.

## 4. Ergebnisse

Zum Beleg der oben geäußerten Vermutung sei nachfolgend das oben gezeigte Gel vor der Silberfärbung in der zuerst erfolgten Coomassiefärbung gezeigt (Abb. 45). Man erkennt deutlich, dass die hierin auffällig dicken und intensiv gefärbten Banden im silbergefärbten Gel immer noch als solche imponieren und damit den Schluss zulassen, dass die Unterschiede in den silbergefärbten Gelen auch mit einem Proteinmengenunterschied korrelieren.

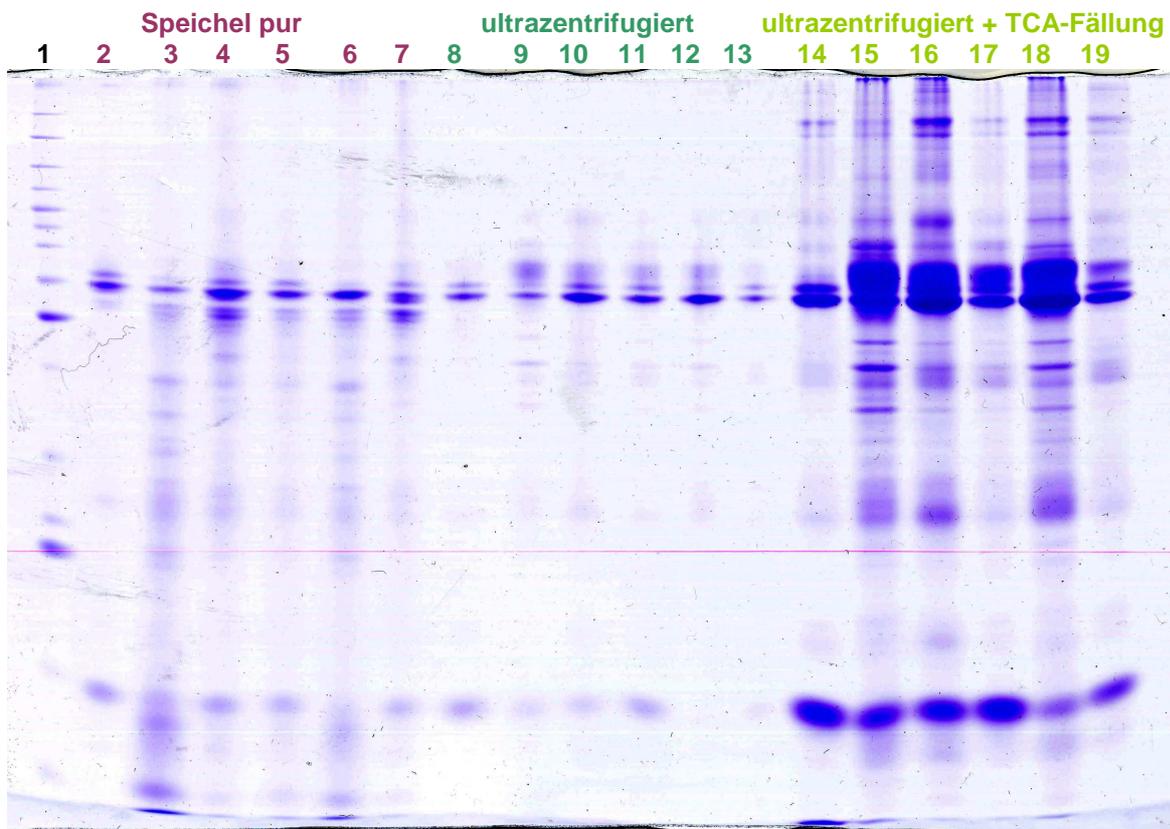


Abb. 45: Elektrophoretische Separation von Speichelproben aller Probanden in unterschiedlicher Aufbereitung mittels 15%igem High-Tris-Gel, **Coomassiefärbung** (gleiches Gel wie Abb.44 vor der Silberfärbung)

### Legende:

- 1: **Bench-Marker™ (10 bis 220 kDa)**
- 2 – 7: **Vollspeichel der Probanden 1 bis 6, pur mit 2-fach Lämmli-Puffer**
- 8 – 13: **Vollspeichel der Probanden 1 bis 6, ultrazentrifugiert mit 2-fach Lämmli-Puffer**
- 14 – 19: **Vollspeichel der Probanden 1 bis 6, ultrazentrifugiert, TCA-Fällung mit 2-fach Lämmli-Puffer**

### 4.3 Analysetabellen

Die Analysesoftware lieferte nach der Detektierung der einzelnen Banden in den Gelen umfangreiche „Matrix - und Comparisons-Tabellen“. Die Comparisons - Tabellen (Abb. 46) enthielten Angaben über Bandenanzahl, Nummerierung jeder einzelnen Bande und das im Vergleich zur Markerbande errechnete Molekulargewicht bis zur dritten Nachkommastelle. Wie weiter oben schon beschrieben, wurden aufgrund der unregelmäßigen Verläufe der Banden gleichen Molekulargewichtes den Banden im Gel differente Werte zugewiesen, so dass eine detaillierte Auswertung jeder einzelnen Bande nicht stattfinden konnte. Somit ist es durchaus möglich, dass etwaige regelmäßig fehlende Banden bei bestimmten Werkstoffen oder nach entsprechenden Zeiten hier nicht entdeckt werden konnten. Eine ebenso mitgelieferte Volumenangabe zu jeder einzelnen Bande konnte zur weiteren Analyse nicht verwendet werden, da dazu jede einzelne Bande manuell hätte justiert werden müssen.

Gel 1 (Proband 1 , Zeit: 3 min)

Bench-Marker™			Gold		
Bande	Volumen	MW (kDa)	Bande	Volumen	MW (kDa)
1	111.962,09	220	1	164.475,26	315,294
2	89.777,53	160	2	12.021,02	287,059
3	50.993,00	120	3	8.305,13	278,235
4	43.743,96	100	4	5.575,97	271,176
5	78.660,54	90	5	17.518,62	265,882
6	56.905,00	80	6	2.119,00	206,51
7	33.448,00	70	7	69.331,24	140,583
8	68.335,94	60	8	17,5	116,316
9	101.510,00	50	9	482,08	108,774
10	63.746,00	40	10	183,23	106,898
11	146.108,00	30	11	10.994,50	92,85
12	105.055,12	25	12	35.549,56	76,41
13	189.449,00	20	13	73.027,54	66,713
14	203.861,50	15	14	80.394,20	64,615
15	176.518,00	10	15	86.442,84	60,364
			16	107.642,03	57,467
			17	56.127,64	55,808

Abb. 46: Ausschnitt aus einer **Comparison-Tabelle**. Aus der Bandendicke wurde ein Volumen für die jeweilige Bande errechnet (Funktion war nicht justiert und wurde bei den Auswertungen nicht verwendet). Daneben wurden alle gefundenen Banden fortlaufend nummeriert und mit dem errechneten Molekulargewicht in kDa angegeben

#### 4. Ergebnisse

Die Matrix-Tabellen (Abb. 47) stellen eine Vereinfachung der obigen Tabelle dar, indem die Banden durch 0 und 1 als entweder vorhanden oder fehlend gekennzeichnet wurden.

		3 min bukkal Proband 1					
Bande	MW (kDa)	Gold	Keramik	Teflon	Kunststoff	Schmelz	Titan
1	327,899			1			
2	320,588					1	
3	314,039	1		1			
4	309,818		1		1		
5	305,462						1
6	302,613						
7	299,55		1			1	
8	293,714						
9	290,588						
10	287,059	1					
11	278,235	1					
12	275,395			1	1		
13	271,303	1	1				
14	267,294	1					
15	261,361		1				
16	257,059						
17	251,429				1		
18	248,269			1		1	1
19	244,706						
20	238,618		1		1		
21	233,714		1				
22	228,571						
23	223,529						
24	214,37						1

Abb. 47: Ausschnitt aus einer Matrix-Tabelle. „1“ steht für „Bande vorhanden“, in Spalte 1 sind alle Banden innerhalb eines Gels fortlaufend nummeriert, Spalte 2 gibt das errechnete Molekulargewicht an.

Aus diesen Tabellen, wovon jede einzelne eines zugehörigen Geles über 7 DIN A4 Seiten reichte, wurden neue Tabellen erstellt (Abb. 48), die nur noch Angaben über die Bandenanzahl in einem von 15 resultierenden Molekulargewichtsintervallen enthielten.

## 4. Ergebnisse

Legende:			
Proband (Geschl.)	Lokalisation	Zeit	Werkstoff
Proband 1 (m)	1: bukkal	1: 3 min	1: Gold
Proband 2 (w)	2: palatinal	2: 30 min	2: Keramik
Proband 3 (m)		3: 120 min	3: Teflon
Proband 4 (w)			4: Kunststoff
Proband 5 (m)			5: Schmelz
Proband 6 (w)			6: Titan
			7: Glas
			8: Komposit
			9: Glasionomerzement
			10: Amalgam

				Intervalle (in kDa) von / bis (Anzahl der detektierten Banden)		
n = 6	n = 2	n = 3	n = 10	>220	220/160	160/120
Proband	Lokalisation	Zeit	Werkstoff	0	1	2
1	1	1	1	5	1	1
1	1	1	2	6	3	1
1	1	1	3	4	2	1
1	1	1	4	4	3	1
1	1	1	5	3	2	1
1	1	1	6	2	2	1
1	1	1	7	3	2	1
1	1	1	8	5	2	1
1	1	1	9	5	2	2
1	1	1	10	4	1	1
1	2	1	1	3	1	1
1	2	1	2	3	2	1
1	2	1	3	3	1	1

Abb. 48: Ausschnitt aus einer selbst erstellten Statistiktabelle für die Analyse

Die Probanden wurden mit 1 bis 6, die Lokalisationen mit 1 und 2, die Zeiten mit 1 bis 3 und die Werkstoffe mit 1 bis 10 und die Markerintervalle mit 0 bis 15 durchnummeriert (siehe auch Tabellenkopf!).

### 4.4 Bandenanzahl der elektrophoretisch separierten Pellikelproben

Anhand der Grundlage des äußerst umfangreichen Datenmaterials ließen sich vielfältigste Auflistungen entwerfen (Tab. 13 – 28, Diag. 1 – 16)

Die Kernaussage lautet, dass die durchschnittliche Bandenanzahl der elektrophoretisch separierten Pellikelproben unabhängig von Substratoberfläche, Lokalisation und Geschlecht mit der Tragezeit (3 min bis 120 min) signifikant ( $p \leq 0,001$ ) zunimmt.

## 4. Ergebnisse

Tab. 13: Bandenanzahl in den elektrophoretisch separierten Pellikelproben. **Proband 1** (je Werkstoff, Expositionszeit und Lokalisation)

Bandenanzahl Proband 1							
Zeit		3 min		30 min		120 min	
Lokalisation		bukkal	palatinal	bukkal	palatinal	bukkal	palatinal
Werkstoff	Gold	39	39	32	33	42	41
	Keramik	39	38	49	43	42	42
	Teflon	44	32	49	37	41	49
	Kunststoff	37	33	41	37	43	43
	Schmelz	29	33	38	49	44	44
	Titan	31	34	43	42	44	35
	Glas	35	34	46	45	43	39
	Komposit	37	33	44	38	40	35
	GIZ	39	39	44	38	45	40
	Amalgam	37	48	42	35	42	46

Tab. 14: Bandenanzahl in den elektrophoretisch separierten Pellikelproben. **Proband 2** (je Werkstoff, Expositionszeit und Lokalisation)

Bandenanzahl Proband 2							
Zeit		3 min		30 min		120 min	
Lokalisation		bukkal	palatinal	bukkal	palatinal	bukkal	palatinal
Werkstoff	Gold	37	39	46	38	45	43
	Keramik	37	32	42	43	44	44
	Teflon	44	55	56	38	63	45
	Kunststoff	39	47	55	41	64	45
	Schmelz	41	42	48	46	52	48
	Titan	41	42	46	36	53	48
	Glas	42	39	51	39	48	41
	Komposit	40	45	48	33	48	46
	GIZ	42	37	45	38	44	44
	Amalgam	40	34	48	40	41	43

Tab. 15: Bandenanzahl in den elektrophoretisch separierten Pellikelproben. **Proband 3** (je Werkstoff, Expositionszeit und Lokalisation)

Bandenanzahl Proband 3							
Zeit		3 min		30 min		120 min	
Lokalisation		bukkal	palatinal	bukkal	palatinal	bukkal	palatinal
Werkstoff	Gold	41	44	39	44	48	55
	Keramik	44	41	39	49	48	55
	Teflon	46	41	39	43	47	50
	Kunststoff	42	44	45	38	48	54
	Schmelz	38	44	40	43	53	55
	Titan	41	38	46	48	50	47
	Glas	32	46	47	43	55	47
	Komposit	43	40	48	46	48	55
	GIZ	43	36	43	47	54	51
	Amalgam	40	40	47	46	49	65

## 4. Ergebnisse

Tab. 16: Bandenanzahl in den elektroforetisch separierten Pellikelproben. **Proband 4** (je Werkstoff, Expositionszeit und Lokalisation)

Bandenanzahl Proband 4							
Zeit		3 min		30 min		120 min	
Lokalisation		bukkal	palatinal	bukkal	palatinal	bukkal	palatinal
Werkstoff	Gold	40	36	34	37	41	44
	Keramik	42	37	49	39	42	44
	Teflon	44	41	37	37	41	42
	Kunststoff	44	40	47	44	49	54
	Schmelz	42	46	38	36	43	48
	Titan	39	38	40	34	53	57
	Glas	37	41	51	33	47	43
	Komposit	36	44	55	37	54	38
	GIZ	46	43	46	30	44	44
	Amalgam	43	43	45	29	49	42

Tab. 17: Bandenanzahl in den elektroforetisch separierten Pellikelproben. **Proband 5** (je Werkstoff, Expositionszeit und Lokalisation)

Bandenanzahl Proband 5							
Zeit		3 min		30 min		120 min	
Lokalisation		bukkal	palatinal	bukkal	palatinal	bukkal	palatinal
Werkstoff	Gold	40	41	35	37	37	38
	Keramik	41	40	37	42	42	42
	Teflon	31	36	48	36	51	37
	Kunststoff	48	41	40	44	43	35
	Schmelz	45	41	50	41	44	45
	Titan	35	34	49	37	51	37
	Glas	35	35	44	37	44	41
	Komposit	39	38	42	44	46	41
	GIZ	42	36	37	35	41	36
	Amalgam	44	40	45	49	37	36

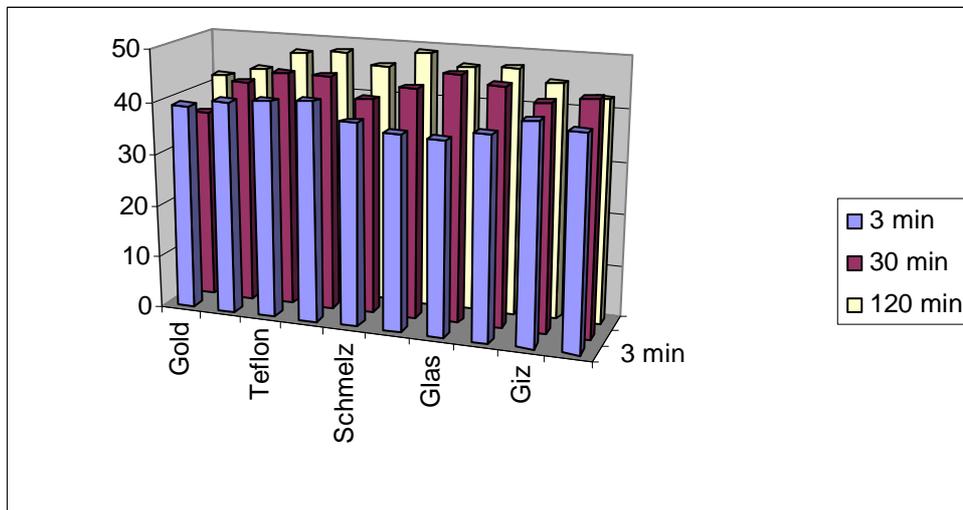
Tab. 18: Bandenanzahl in den elektroforetisch separierten Pellikelproben. **Proband 6** (je Werkstoff, Expositionszeit und Lokalisation)

Bandenanzahl Proband 6							
Zeit		3 min		30 min		120 min	
Lokalisation		bukkal	palatinal	bukkal	palatinal	bukkal	palatinal
Werkstoff	Gold	39	43	32	45	39	46
	Keramik	41	37	41	46	45	36
	Teflon	39	36	41	37	42	40
	Kunststoff	42	36	42	40	42	42
	Schmelz	37	36	34	36	40	41
	Titan	37	37	39	40	43	44
	Glas	40	35	43	44	44	40
	Komposit	37	35	36	42	47	31
	GIZ	37	38	43	37	42	38
	Amalgam	38	32	39	40	38	43

## 4. Ergebnisse

Tab. 19: Durchschnittliche Bandenanzahl gemittelt über **alle Probanden** für die **bukkalen** Pellikelproben zu den 3 Expositionszeiten

Durchschnittliche Bandenanzahl bukkal			
	3 min	30 min	120 min
<b>Gold</b>	39,33	36,33	42
<b>Keramik</b>	40,66	42,83	43,83
<b>Teflon</b>	41,33	45	47,5
<b>Kunststoff</b>	42	45	48,16
<b>Schmelz</b>	38,66	41,33	46
<b>Titan</b>	37,33	43,83	49
<b>Glas</b>	36,83	47	46,83
<b>Komposit</b>	38,66	45,5	47,16
<b>GIZ</b>	41,5	43	45
<b>Amalgam</b>	40,33	44,33	42,66

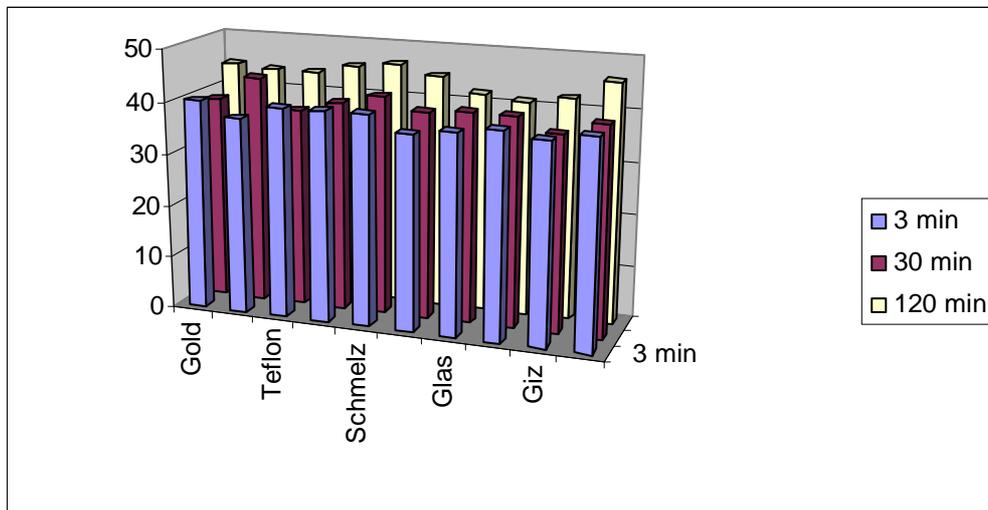


Diag. 1: Durchschnittliche Bandenanzahlen gemittelt über **alle Probanden** für die **bukkalen** Pellikelproben zu den 3 Expositionszeiten

## 4. Ergebnisse

Tab. 20: Durchschnittliche Bandenzahl gemittelt über **alle Probanden** für die **palatinalen** Pellikelproben zu den 3 Expositionszeiten

Durchschnittliche Bandenzahl palatinal			
	3 min	30 min	120 min
<b>Gold</b>	40,33	39	44,5
<b>Keramik</b>	37,5	43,66	43,83
<b>Teflon</b>	40,16	38	43,83
<b>Kunststoff</b>	40,16	40	45,5
<b>Schmelz</b>	40,33	41,83	46,33
<b>Titan</b>	37,16	39,5	44,66
<b>Glas</b>	38,33	40,16	41,83
<b>Komposit</b>	39,16	40	41
<b>GIZ</b>	38,16	37,5	42,16
<b>Amalgam</b>	39,5	39,83	45,83

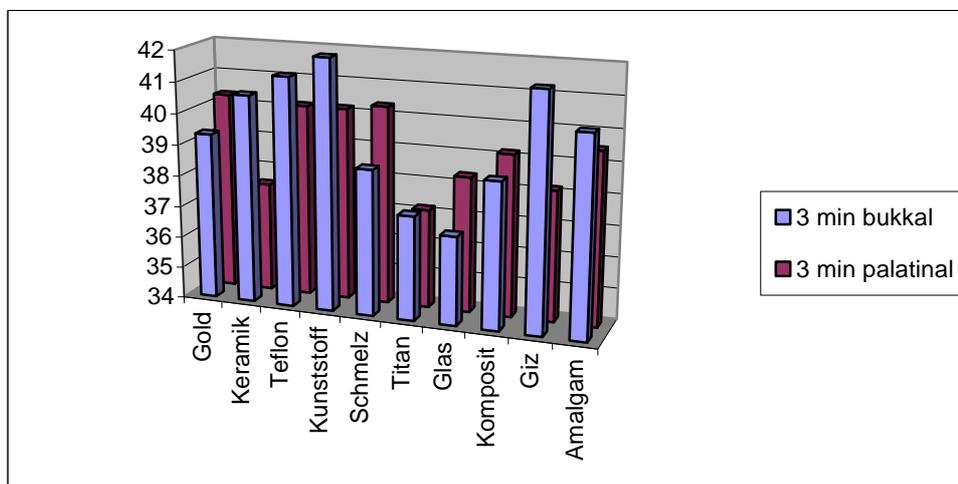


Diag. 2: Durchschnittliche Bandenzahlen gemittelt über **alle Probanden** für die **palatinalen** Pellikelproben zu den 3 Expositionszeiten

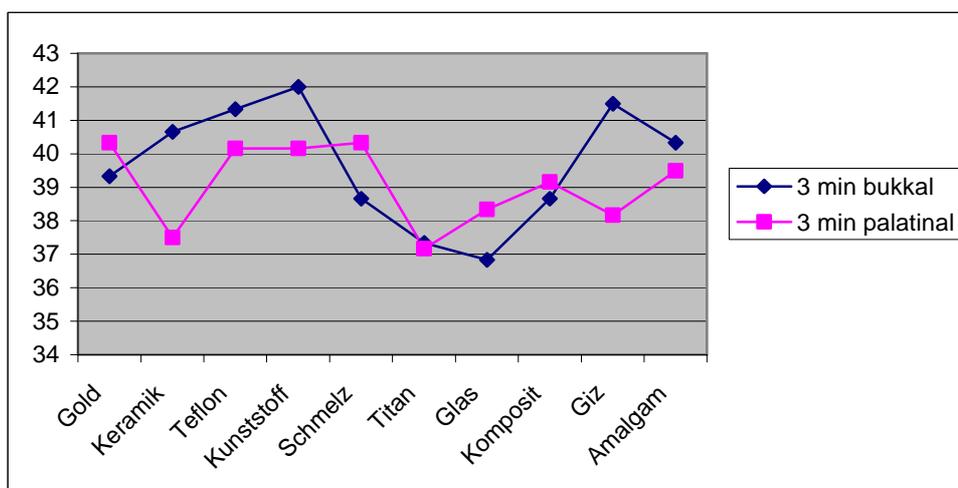
## 4. Ergebnisse

Tab. 21: Durchschnittliche Bandenanzahl der Pellikelproben der einzelnen Werkstoffe gemittelt über **alle Probanden** (Lokalisation bukkal bzw. palatinal), Tragezeit **3 min**

Durchschnittliche Bandenanzahl bukkal/palatinal 3 min		
	3 min bukkal	3 min palatinal
<b>Gold</b>	39,33	40,33
<b>Keramik</b>	40,66	37,5
<b>Teflon</b>	41,33	40,16
<b>Kunststoff</b>	42	40,16
<b>Schmelz</b>	38,66	40,33
<b>Titan</b>	37,33	37,16
<b>Glas</b>	36,83	38,33
<b>Komposit</b>	38,66	39,16
<b>GIZ</b>	41,5	38,16
<b>Amalgam</b>	40,33	39,5



Diag. 3: Durchschnittliche Bandenanzahl der Pellikelproben der einzelnen Werkstoffe gemittelt über **alle Probanden** (Lokalisation bukkal bzw. palatinal), Tragezeit **3 min**

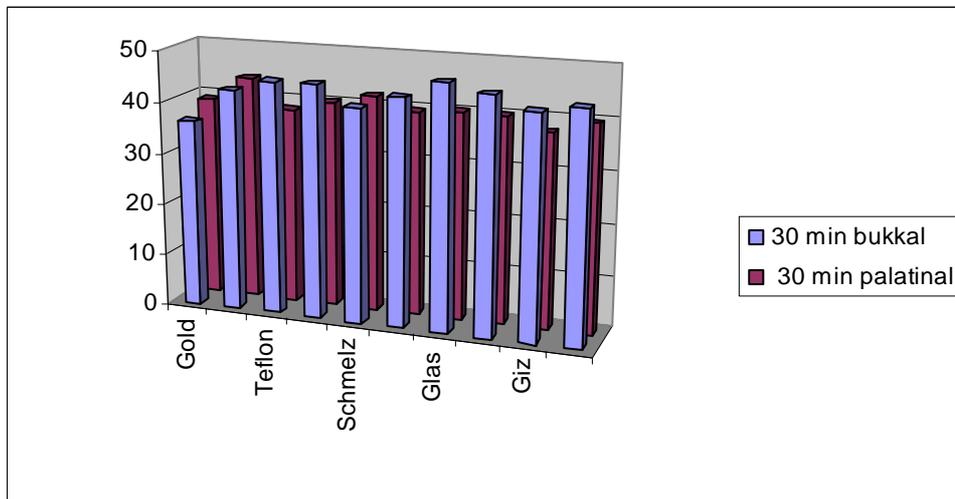


Diag. 4: Durchschnittliche Bandenanzahl der Pellikelproben der einzelnen Werkstoffe gemittelt über **alle Probanden** (Lokalisation bukkal bzw. palatinal) Tragezeit **3 min**

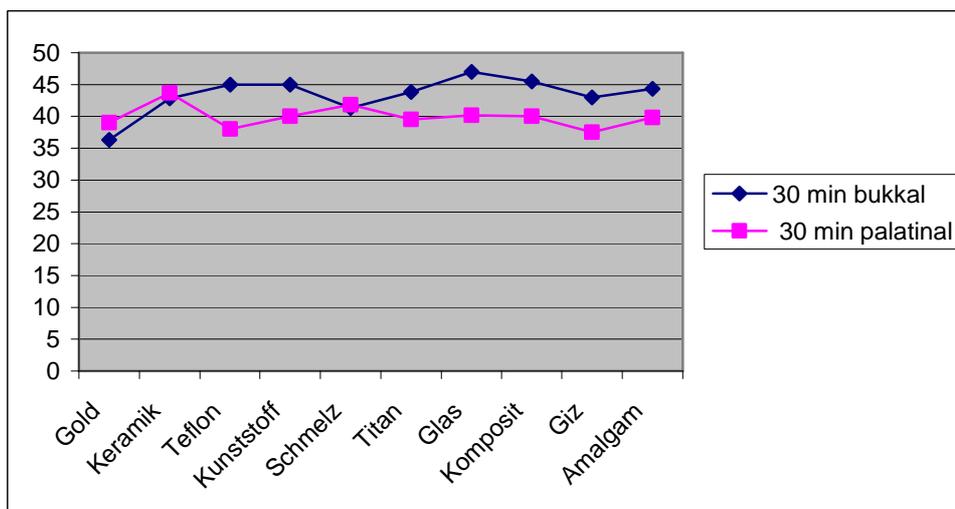
## 4. Ergebnisse

Tab. 22: Durchschnittliche Bandenanzahl der Pellikelproben der einzelnen Werkstoffe gemittelt über **alle Probanden** (Lokalisation bukkal bzw. palatinal), Tragezeit **30 min**

Durchschnittliche Bandenanzahl bukkal/palatinal 30 min		
	30 min bukkal	30 min palatinal
<b>Gold</b>	36,33	39
<b>Keramik</b>	42,83	43,66
<b>Teflon</b>	45	38
<b>Kunststoff</b>	45	40
<b>Schmelz</b>	41,33	41,83
<b>Titan</b>	43,83	39,5
<b>Glas</b>	47	40,16
<b>Komposit</b>	45,5	40
<b>GIZ</b>	43	37,5
<b>Amalgam</b>	44,33	39,83



Diag. 5: Durchschnittliche Bandenanzahl der Pellikelproben der einzelnen Werkstoffe gemittelt über **alle Probanden** (Lokalisation bukkal bzw. palatinal), Tragezeit **30 min**

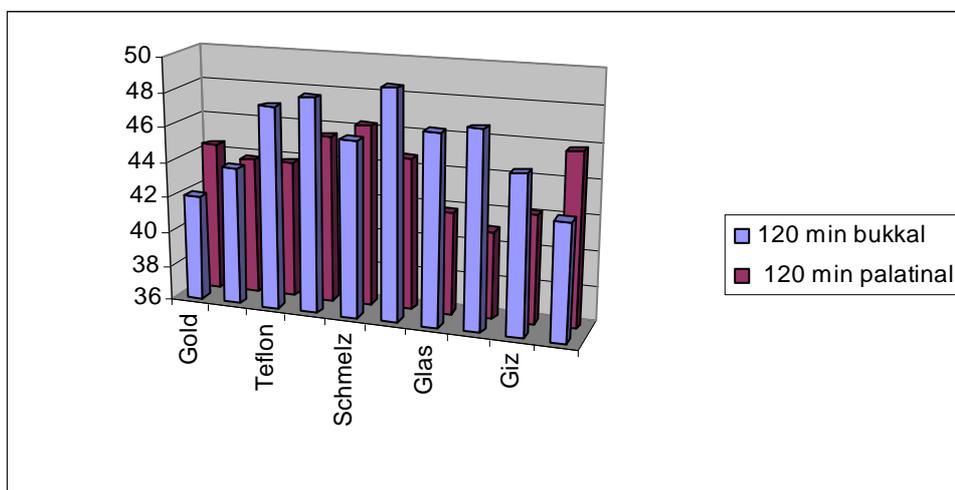


Diag. 6: Durchschnittliche Bandenanzahl der Pellikelproben der einzelnen Werkstoffe gemittelt über **alle Probanden** (Lokalisation bukkal bzw. palatinal), Tragezeit **30 min**

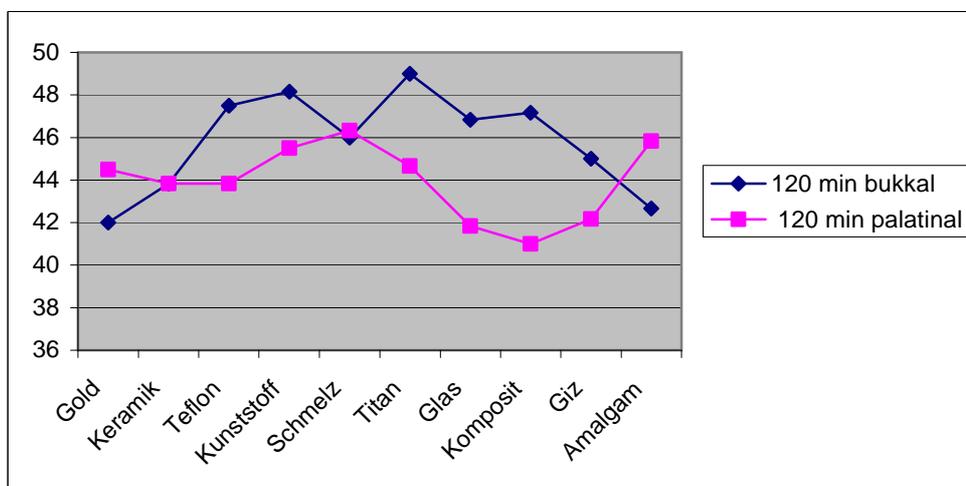
## 4. Ergebnisse

Tab. 22: Durchschnittliche Bandenanzahl der Pellikelproben der einzelnen Werkstoffe gemittelt über **alle Probanden** (Lokalisation bukkal bzw. palatinal), Tragezeit **120 min**

Durchschnittliche Bandenanzahl bukkal/palatinal 120 min		
	120 min bukkal	120 min palatinal
<b>Gold</b>	42	44,5
<b>Keramik</b>	43,83	43,83
<b>Teflon</b>	47,5	43,83
<b>Kunststoff</b>	48,16	45,5
<b>Schmelz</b>	46	46,33
<b>Titan</b>	49	44,66
<b>Glas</b>	46,83	41,83
<b>Komposit</b>	47,16	41
<b>GIZ</b>	45	42,16
<b>Amalgam</b>	42,66	45,83



Diag. 7: Durchschnittliche Bandenanzahl der Pellikelproben der einzelnen Werkstoffe gemittelt über **alle Probanden** (Lokalisation bukkal bzw. palatinal), Tragezeit **120 min**

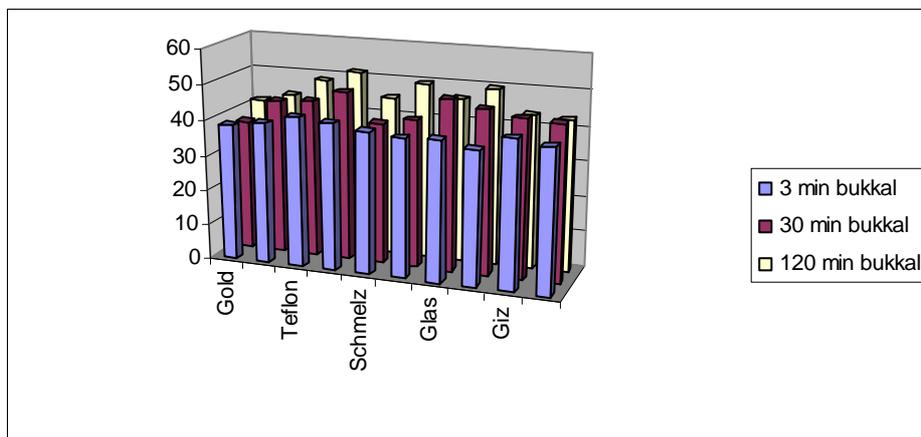


Diag. 8: Durchschnittliche Bandenanzahl der Pellikelproben der einzelnen Werkstoffe gemittelt über **alle Probanden** (Lokalisation bukkal bzw. palatinal), Tragezeit **120 min**

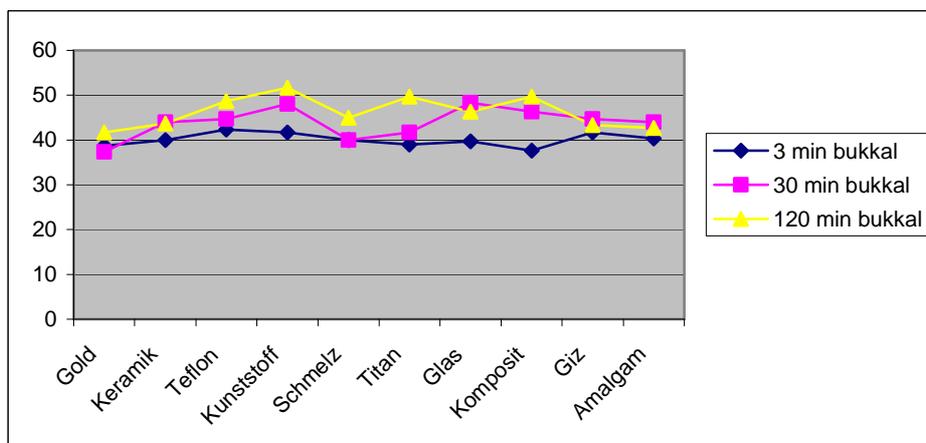
## 4. Ergebnisse

Tab. 24: Durchschnittliche Bandenanzahl der **bukkalen** Pellikelproben der einzelnen Werkstoffe aller **weiblichen** Probanden zu den 3 Expositionszeiten

Durchschnittliche Bandenanzahl weibliche Probanden				
Zeit		3 min	30 min	120 min
Lokalisation		bukkal	bukkal	bukkal
Werkstoff	Gold	38,66	37,33	41,66
	Keramik	40	44	43,66
	Teflon	42,33	44,66	48,66
	Kunststoff	41,66	48	51,66
	Schmelz	40	40	45
	Titan	39	41,66	49,66
	Glas	39,66	48,33	46,33
	Komposit	37,66	46,33	49,66
	GIZ	41,66	44,66	43,33
	Amalgam	40,33	44	42,66



Diag. 9: Durchschnittliche Bandenanzahl der **bukkalen** Pellikelproben der einzelnen Werkstoffe aller **weiblichen** Probanden zu den 3 Expositionszeiten

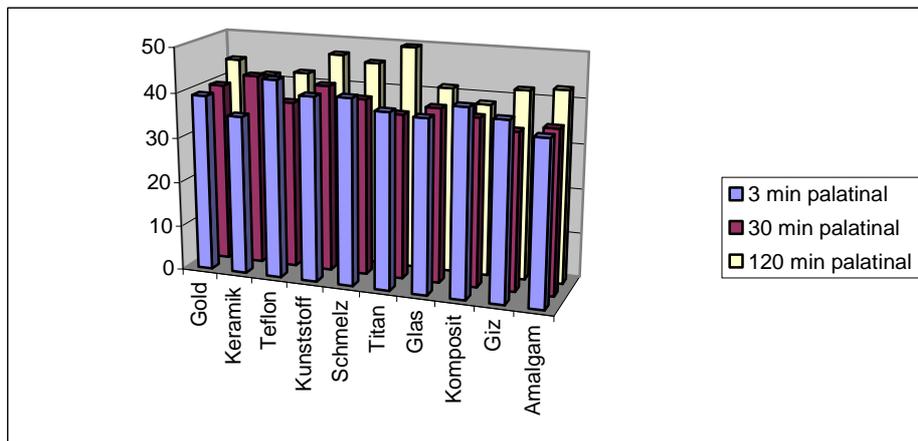


Diag. 10: Durchschnittliche Bandenanzahl der **bukkalen** Pellikelproben der einzelnen Werkstoffe aller **weiblichen** Probanden zu den 3 Expositionszeiten

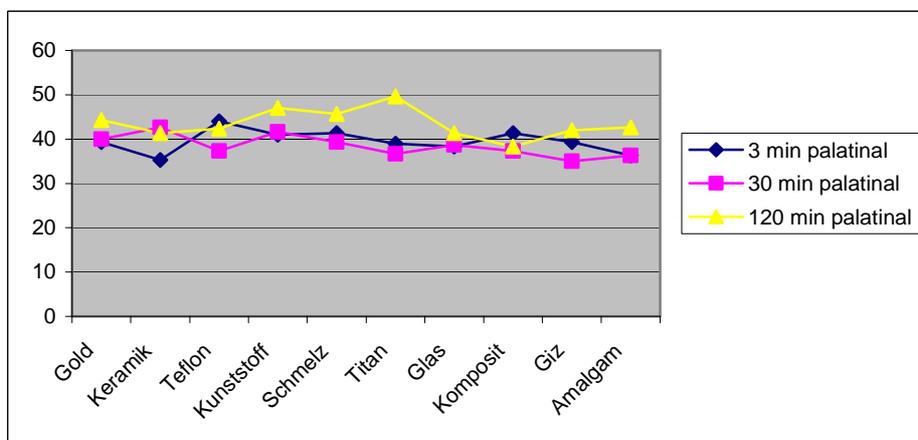
## 4. Ergebnisse

Tab. 25: Durchschnittliche Bandenanzahl der **palatinalen** Pellikelproben der einzelnen Werkstoffe aller **weiblichen** Probanden zu den 3 Expositionszeiten

Durchschnittliche Bandenanzahl weibliche Probanden				
Zeit		3 min	30 min	120 min
Lokalisation		palatinal	palatinal	palatinal
Werkstoff	Gold	39,33	40	44,33
	Keramik	35,33	42,66	41,33
	Teflon	44	37,33	42,33
	Kunststoff	41	41,66	47
	Schmelz	41,33	39,33	45,66
	Titan	39	36,66	49,66
	Glas	38,33	38,66	41,33
	Komposit	41,33	37,33	38,33
	GIZ	39,33	35	42
	Amalgam	36,33	36,33	42,66



Diag. 11: Durchschnittliche Bandenanzahl der **palatinalen** Pellikelproben der einzelnen Werkstoffe aller **weiblichen** Probanden zu den 3 Expositionszeiten

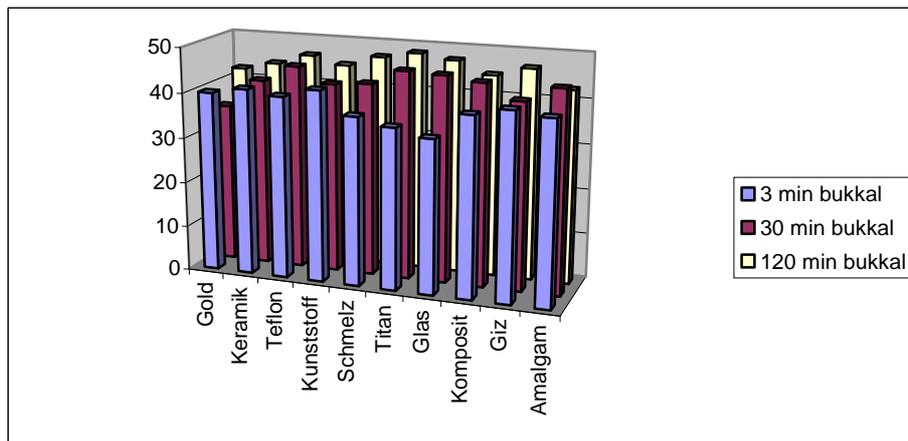


Diag. 12: Durchschnittliche Bandenanzahl der **palatinalen** Pellikelproben der einzelnen Werkstoffe aller **weiblichen** Probanden zu den 3 Expositionszeiten

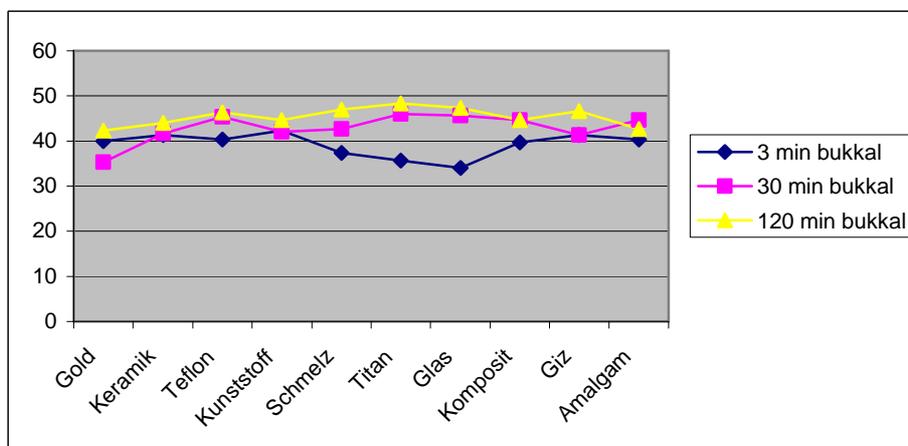
## 4. Ergebnisse

Tab. 26: Durchschnittliche Bandenanzahl der **bukkalen** Pellikelproben der einzelnen Werkstoffe aller **männlichen** Probanden zu den 3 Expositionszeiten

Durchschnittliche Bandenanzahl männliche Probanden				
Zeit		3 min	30 min	120 min
Lokalisation		bukkal	bukkal	bukkal
Werkstoff	Gold	40	35,33	42,33
	Keramik	41,33	41,66	44
	Teflon	40,33	45,33	46,33
	Kunststoff	42,33	42	44,66
	Schmelz	37,33	42,66	47
	Titan	35,66	46	48,33
	Glas	34	45,66	47,33
	Komposit	39,66	44,66	44,66
	GIZ	41,33	41,33	46,66
	Amalgam	40,33	44,66	42,66



Diag. 13: Durchschnittliche Bandenanzahl der **bukkalen** Pellikelproben der einzelnen Werkstoffe aller **männlichen** Probanden zu den 3 Expositionszeiten

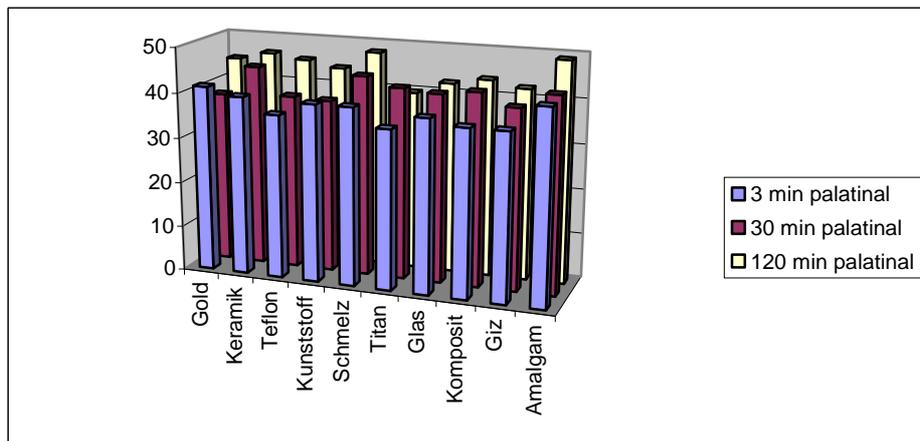


Diag. 14: Durchschnittliche Bandenanzahl der **bukkalen** Pellikelproben der einzelnen Werkstoffe aller **männlichen** Probanden zu den 3 Expositionszeiten

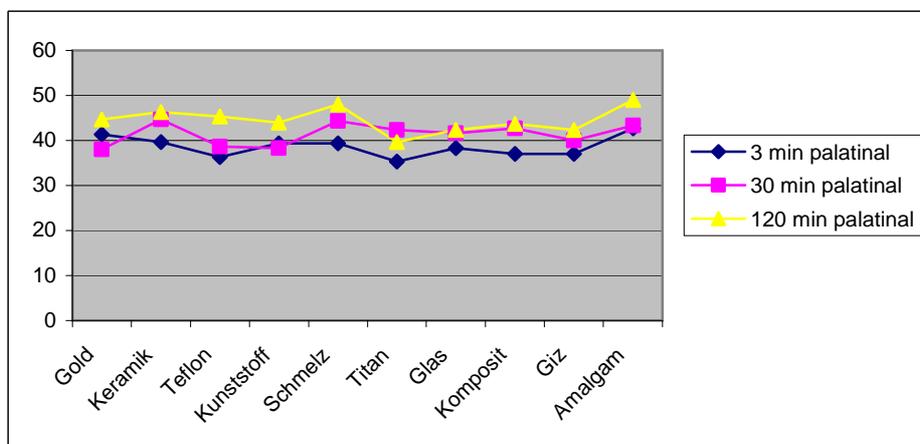
## 4. Ergebnisse

Tab. 27: Durchschnittliche Bandenanzahl der **palatinalen** Pellikelproben der einzelnen Werkstoffe aller **männlichen** Probanden zu den 3 Expositionszeiten

Durchschnittliche Bandenanzahl männliche Probanden				
Zeit		3 min	30 min	120 min
Lokalisation		palatinal	palatinal	palatinal
Werkstoff	Gold	41,33	38	44,66
	Keramik	39,66	44,66	46,33
	Teflon	36,33	38,66	45,33
	Kunststoff	39,33	38,33	44
	Schmelz	39,33	44,33	48
	Titan	35,33	42,33	39,66
	Glas	38,33	41,66	42,33
	Komposit	37	42,66	43,66
	GIZ	37	40	42,33
	Amalgam	42,66	43,33	49



Diag. 15: Durchschnittliche Bandenanzahl der **palatinalen** Pellikelproben der einzelnen Werkstoffe aller **männlichen** Probanden zu den 3 Expositionszeiten



Diag. 16: Durchschnittliche Bandenanzahl der **palatinalen** Pellikelproben der einzelnen Werkstoffe aller **männlichen** Probanden zu den 3 Expositionszeiten

#### 4. Ergebnisse

Tab. 28: Durchschnittliche Bandenanzahlen der Pellikelproben der einzelnen Werkstoffe gemittelt über **alle Probanden**, zu den **drei Zeiten** und den **beiden Lokalisationen**, daneben jeweils die **minimale** und die **maximale** gefundene Bandenanzahl

Durchschnittliche Bandenanzahl Probanden 1 bis 6 ( sowie kleinster/größter Wert )							
Zeit		3 min					
Lokalisation		bukkal			palatinal		
			von	bis		von	bis
Werkstoff	Gold	39,33	37	41	40,33	36	44
	Keramik	40,66	37	44	37,5	32	41
	Teflon	42,33	31	46	40,16	32	55
	Kunststoff	42	37	48	40,16	33	47
	Schmelz	38,66	29	45	40,33	33	46
	Titan	37,33	31	41	37,16	34	42
	Glas	36,83	32	42	38,33	34	46
	Komposit	38,66	36	43	39,16	33	45
	GIZ	41,5	37	46	38,16	36	43
	Amalgam	40,33	37	44	39,5	32	48
Zeit		30 min					
Lokalisation		bukkal			palatinal		
			von	bis		von	bis
Werkstoff	Gold	36,33	32	46	39	33	45
	Keramik	42,83	37	49	43,66	39	49
	Teflon	45	37	56	38	36	43
	Kunststoff	45	40	55	40	37	44
	Schmelz	41,33	34	50	41,83	36	49
	Titan	43,83	39	49	39,5	34	48
	Glas	47	43	51	40,16	33	45
	Komposit	45,5	36	55	40	33	46
	GIZ	43	37	46	37,5	30	47
	Amalgam	44,33	39	48	39,83	29	49
Zeit		120 min					
Lokalisation		bukkal			palatinal		
			von	bis		von	bis
Werkstoff	Gold	42	37	48	44,5	38	55
	Keramik	43,83	42	48	43,83	36	55
	Teflon	47,5	41	63	43,83	40	50
	Kunststoff	48,16	42	64	45,5	35	54
	Schmelz	46	40	53	46,33	41	55
	Titan	49	43	53	44,86	35	57
	Glas	46,83	43	55	41,83	39	47
	Komposit	47,16	40	54	41	31	55
	GIZ	45	41	54	42,16	38	51
	Amalgam	42,66	37	49	45,83	36	56

### 4.5 Molekulargewichte der Probandengele

Die Mittelwerte der errechneten Molekulargewichte lagen zwischen 6,1 und 334,37 kDa als kleinster bzw. größter Wert. Alle Werte oberhalb von 220 kDa und unterhalb von 10 kDa müssen mit vorsichtiger Zurückhaltung betrachtet werden, da diese Werte außerhalb der Markerbereiche liegen. Durch die exponentielle Stauchung in der Abstufung (und wiederum aufgrund des „Smile-Effekts“) kam es zwangsläufig zu Messungenauigkeiten!

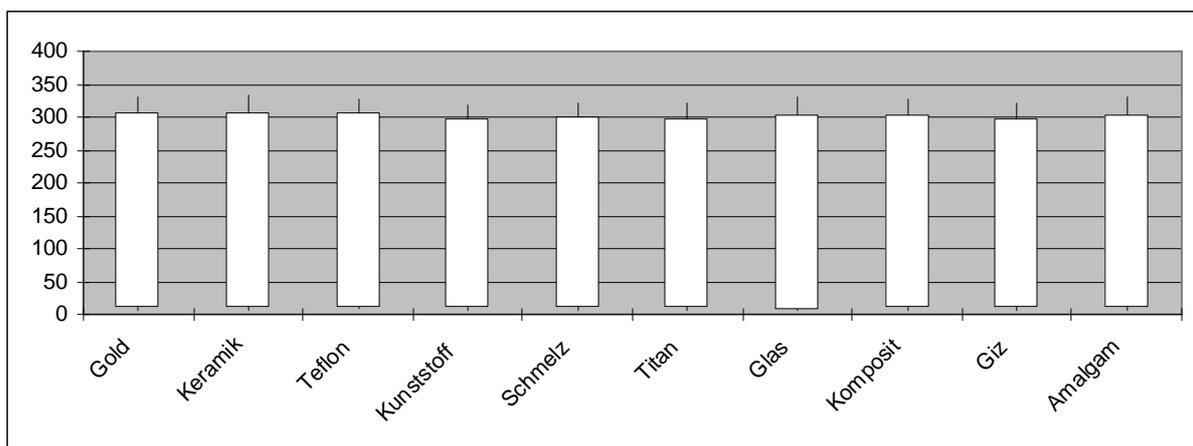
Die durchschnittliche Verteilung der Molekulargewichte in Abhängigkeit von den Zeiten, Lokalisationen, Werkstoffen, Probanden und Geschlechtern war als sehr einheitlich zu bezeichnen, es waren keine generellen, statistisch signifikanten Unterschiede zu ermitteln (Tab. 29 – 31, Diag. 17 – 22).

Innerhalb der Intervalle 9 (50 – 40 kDa), 10 (40 – 30 kDa) und 13 (20 – 15kDa) gab es über die zunehmende Tragedauer einen signifikanten Effekt (ANOVA,  $p \leq 0,001$ ) hinsichtlich der Zunahme der Bandenanzahl innerhalb dieser Molekulargewichtsintervalle (Scheffé – Test). Innerhalb der Materialien gab es ebenso nur Tendenzen in den Intervallen 3 (120 – 100 kDa), 11 (30 – 25 kDa) und 15 (< 10 kDa) (Scheffé – Test).

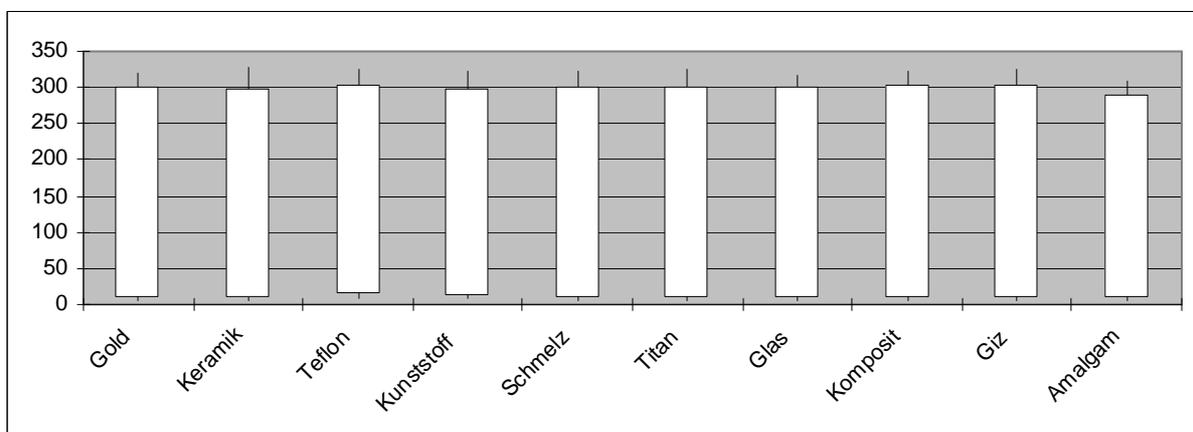
## 4. Ergebnisse

Tab. 29: Durchschnittswerte der Molekulargewichte gemittelt über alle Probanden bei **3 min** Expositionszeit für jeden Werkstoff auf beiden Lokalisationen (bukkal und palatinal). Aufgeführt sind jeweils die Durchschnittswerte der ersten und letzten detektierten Banden der einzelnen Spuren, sowie die gefundenen maximalen und minimalen Werte innerhalb der 6 Probanden für diesen Werkstoff.

Durchschnittliche Molekulargewichte der elektrophoretisch separierten Proteinbanden gemittelt über alle Probanden in kDa, sowie kleinster und größter gefundener Wert											
Zeit		3 min									
Lokalisation		bukkal					palatinal				
		von	max.	min.	bis		von	max.	min.	bis	
Werkstoff	Gold	8,88	330,62	6,5	305,82	Gold	8,44	320	6,25	300,03	
	Keramik	8,68	334,37	6,18	306,73	Keramik	7,99	327,64	6,2	298,38	
	Teflon	10,59	328	8,45	305,69	Teflon	12,92	325,88	8,57	301,84	
	Kunststoff	9,54	318,18	6,94	297,44	Kunststoff	10,73	322,35	8,53	297,64	
	Schmelz	8,16	322,35	6,4	300,49	Schmelz	8,27	321,81	6,3	299,06	
	Titan	8,19	321,81	6,3	297,58	Titan	8,41	325,45	6,49	301,74	
	Glas	6,34	329,41	6,57	302,7	Glas	8,51	318,18	6,63	299,78	
	Komposit	8,41	326,28	6,37	303,14	Komposit	9,02	323,12	6,77	302,2	
	Giz	7,83	320,58	6,57	296,02	Giz	8,57	325	6,6	302,54	
	Amalgam	7,85	329,09	6,1	303,66	Amalgam	8,22	309,03	6,77	288,53	



Diag. 17: „Streubreite“ der Molekulargewichte der separierten Proteinbanden jedes einzelnen Werkstoffes gemittelt über alle Probanden, Lokalisation (**bukkal**), Tragezeit **3 min**

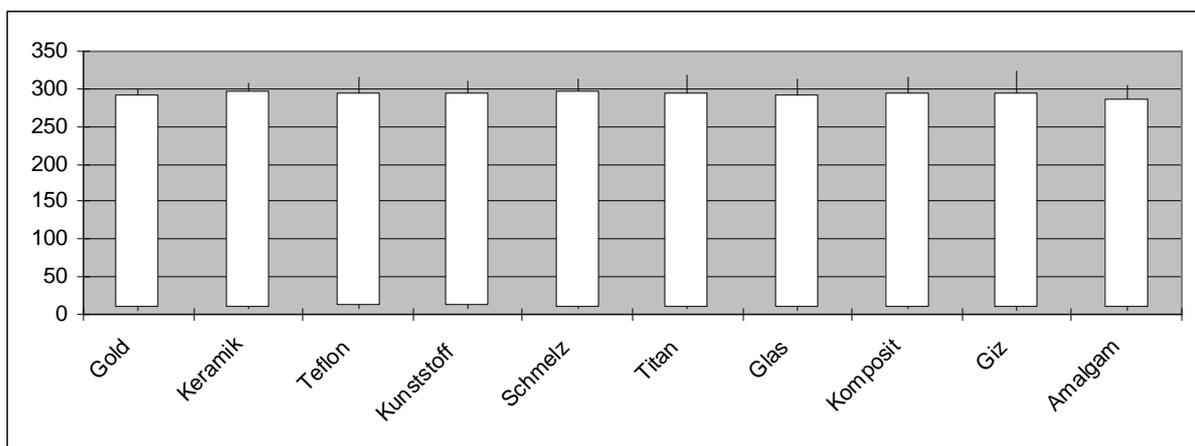


Diag. 18: „Streubreite“ der Molekulargewichte der separierten Proteinbanden jedes einzelnen Werkstoffes gemittelt über alle Probanden, Lokalisation (**palatinal**), Tragezeit **3 min**

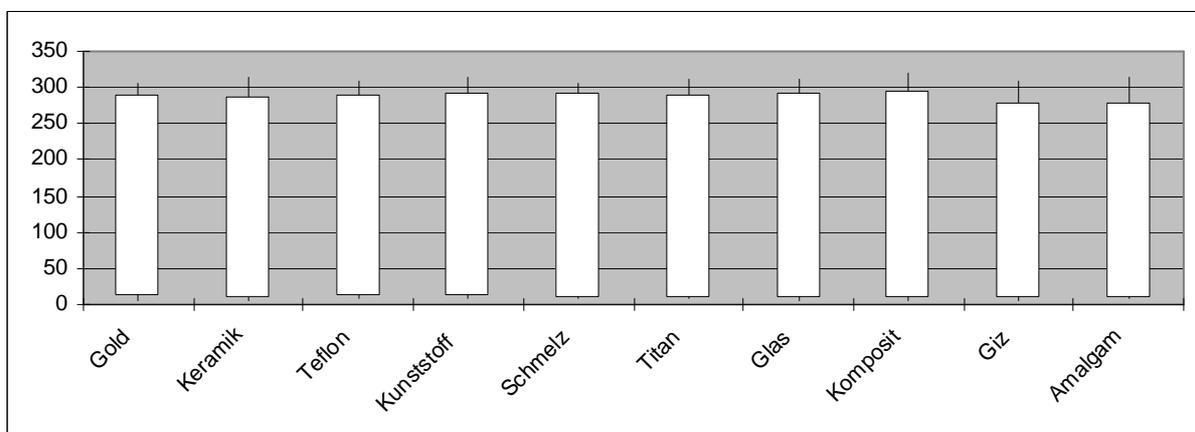
## 4. Ergebnisse

Tab. 30: Durchschnittswerte der Molekulargewichte gemittelt über alle Probanden bei **30 min** Expositionszeit für jeden Werkstoff auf beiden Lokalisationen (bukkal und palatinal). Aufgeführt sind jeweils die Durchschnittswerte der ersten und letzten detektierten Banden der einzelnen Spuren, sowie die gefundenen maximalen und minimalen Werte innerhalb der 6 Probanden für diesen Werkstoff.

Durchschnittliche Molekulargewichte der elektrophoretisch separierten Proteinbanden gemittelt über alle Probanden in kDa, sowie kleinster und größter gefundener Wert											
Zeit		30 min									
Lokalisation		bukkal					palatinal				
		von	max.	min.	bis		von	max.	min.	bis	
Werkstoff	Gold	9,23	300	6,34	292,08	Gold	10,04	305,94	6,69	290,52	
	Keramik	8,89	308,33	6,89	295,97	Keramik	8,75	315	6,47	287,18	
	Teflon	10,66	316,66	8,91	293,64	Teflon	11,81	310	8,93	288,79	
	Kunststoff	9,42	310	7,87	294,66	Kunststoff	9,89	315	8,09	291,32	
	Schmelz	8,93	312,43	6,83	295,76	Schmelz	9,48	306,66	6,89	291,03	
	Titan	8,66	318,33	6,75	294,77	Titan	8,44	312,43	6,89	289,94	
	Glas	8,5	312,43	6,57	292,32	Glas	9,12	311,66	6,87	292,38	
	Komposit	9	315,67	6,93	294,02	Komposit	9,06	318,88	6,88	293,71	
	Giz	8,35	322,16	6,62	295,03	Giz	9,06	309,14	6,78	276,97	
	Amalgam	8,88	304,32	6,57	287,62	Amalgam	8,8	314,28	6,9	278,66	



Diag. 19: „Streubreite“ der Molekulargewichte der separierten Proteinbanden jedes einzelnen Werkstoffes gemittelt über alle Probanden, Lokalisation (**bukkal**), Tragezeit **30 min**

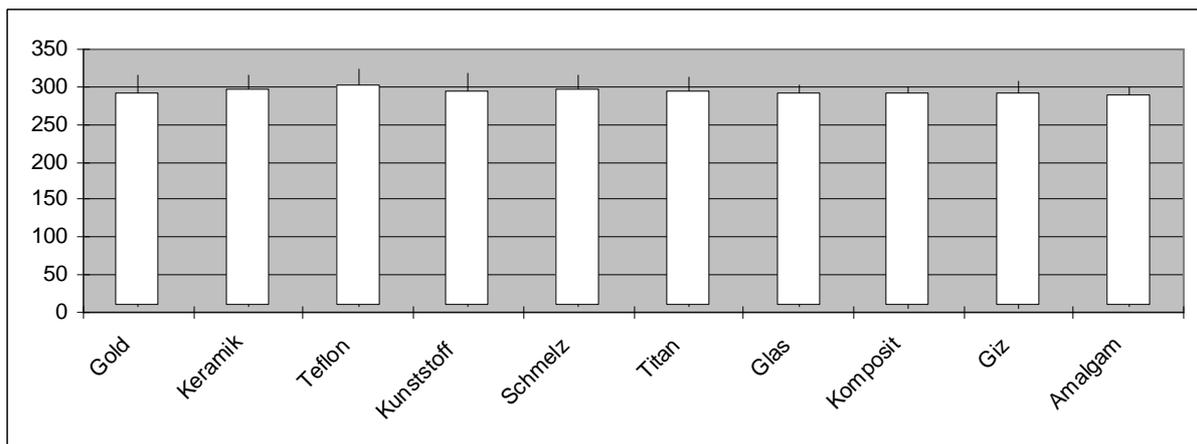


Diag. 20: „Streubreite“ der Molekulargewichte der separierten Proteinbanden jedes einzelnen Werkstoffes gemittelt über alle Probanden, Lokalisation (**palatinal**), Tragezeit **30 min**

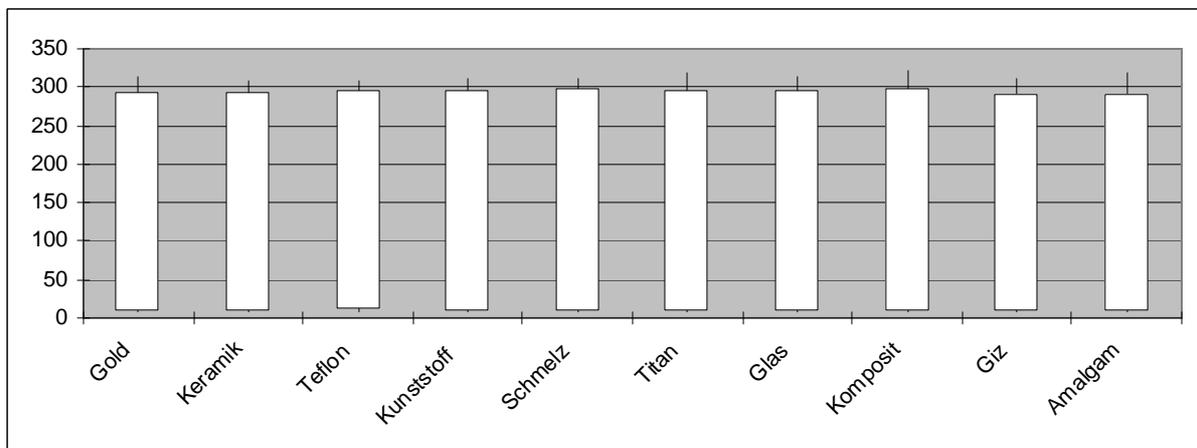
## 4. Ergebnisse

Tab. 31: Durchschnittswerte der Molekulargewichte gemittelt über alle Probanden bei **120 min** Expositionszeit für jeden Werkstoff auf beiden Lokalisationen (bukkal und palatinal). Aufgeführt sind jeweils die Durchschnittswerte der ersten und letzten detektierten Banden der einzelnen Spuren, sowie die gefundenen maximalen und minimalen Werte innerhalb der 6 Probanden für diesen Werkstoff.

Durchschnittliche Molekulargewichte der elektrophoretisch separierten Proteinbanden gemittelt über alle Probanden in kDa, sowie kleinster und größter gefundener Wert											
Zeit		120 min									
Lokalisation		bukkal					palatinal				
		von	max.	min.	bis		von	max.	min.	bis	
Werkstoff	Gold	8,86	314,28	6,74	291,13	Gold	8,37	314,28	7,01	293,47	
	Keramik	8,1	314,28	6,68	296,72	Keramik	7,81	309,14	6,54	291,75	
	Teflon	8,68	323,78	6,66	302,08	Teflon	9,27	307,42	6,98	296,47	
	Kunststoff	8,56	318,33	7,63	293,46	Kunststoff	8,68	310,85	7,17	296,24	
	Schmelz	8,64	316,66	7,85	297,23	Schmelz	8,21	310,9	6,68	298,09	
	Titan	8,5	312,57	7,19	295,33	Titan	7,87	318,18	6,57	296,56	
	Glas	8,72	302,94	6,92	291,68	Glas	8,59	313,52	6,74	295,63	
	Komposit	7,85	299,45	6,61	290,57	Komposit	8,3	320,54	6,76	297,02	
	Giz	7,96	307,56	6,37	290,72	Giz	7,86	311,76	6,61	291,43	
	Amalgam	9,24	299,45	8,3	288,53	Amalgam	8,25	318,18	7,15	290,53	



Diag. 21: „Streubreite“ der Molekulargewichte der separierten Proteinbanden jedes einzelnen Werkstoffes gemittelt über alle Probanden, Lokalisation (**bukkal**), Tragezeit **120 min**



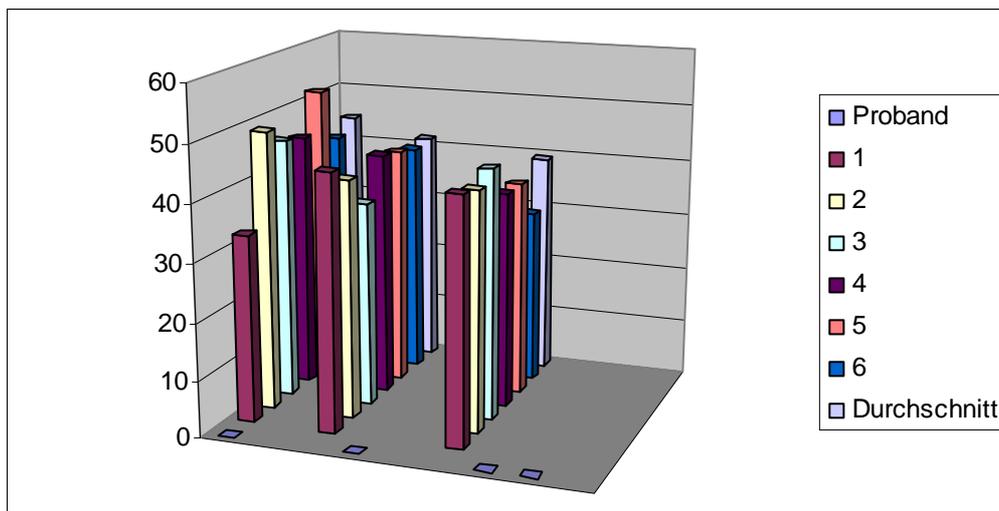
Diag. 22: „Streubreite“ der Molekulargewichte der separierten Proteinbanden jedes einzelnen Werkstoffes gemittelt über alle Probanden, Lokalisation (**palatinal**), Tragezeit **120 min**

### 4.6 Bandenanzahl der Speichelproben

Die Bandenanzahl nahm im Mittel mit jeder Reinigungsstufe ab. Von durchschnittlich 44,5 Banden im reinen Vollspeichel sank ihre Zahl auf durchschnittlich 39,33 Banden im 3. Schritt (Tab. 32, Diag. 23).

Tab. 32: Bandenanzahl der elektrophoretisch separierten und unterschiedlich aufbereiteten Speichelproben der einzelnen Probanden, sowie Durchschnittswert ( $\emptyset$ )

Detektierte Bandenanzahl der elektrophoretisch separierten und unterschiedlich aufbereiteten Speichelproben der Probanden 1 bis 6							
Proband	1	2	3	4	5	6	$\emptyset$
Vollspeichel pur mit 2-fach Lämmli-Puffer	33	49	46	45	52	42	44,5
Vollspeichel ultrazentrifugiert mit 2-fach Lämmli-Puffer	45	42	36	43	42	41	41,5
Vollspeichel ultrazentrifugiert, nach TCA-Fällung mit 2-fach Lämmli-Puffer	43	42	44	38	38	31	39,33



Diag. 23: Bandenanzahl der separierten Speichelproben aller Probanden in Abhängigkeit von den 3 Aufbereitungsschritten (von links nach rechts)

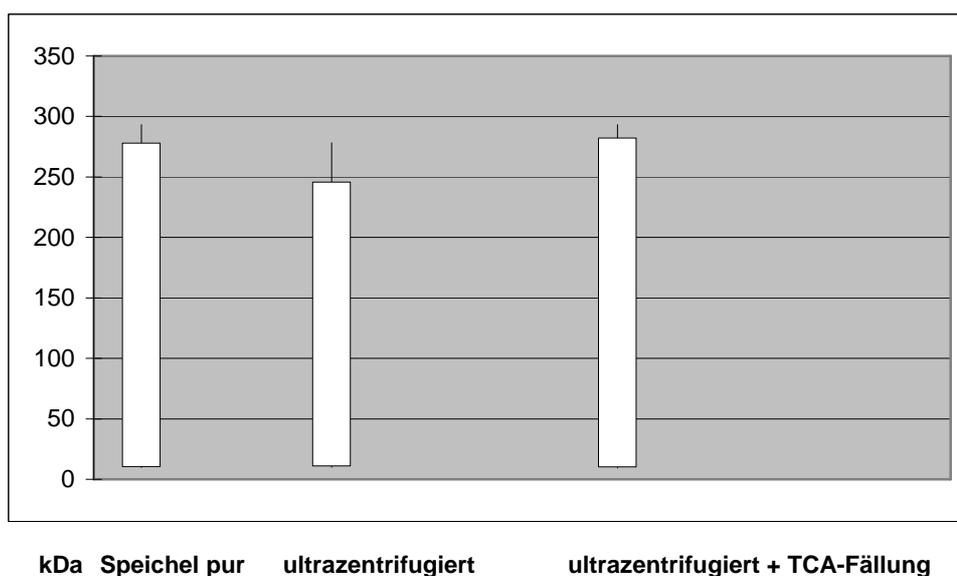
## 4. Ergebnisse

### 4.7 Molekulargewichte der Speichelproben

Die durchschnittlichen Molekulargewichte reichten von 10,06 kDa als kleinstem Wert bis zu 282,21 kDa als größtem Wert innerhalb der 3 Stufen. Der Ausgangsdurchschnittswert von 10,42 kDa wich nur geringfügig vom Schlusdurchschnitt von 10,06 kDa ab. Eine etwas größere Differenz von den übrigen Schlusswerten zeigten die 245,81 kDa gegenüber den 282,21 kDa (Tab. 33, Diag. 24).

Tab. 33: „Streuung“ der Molekulargewichte der separierten Speichelproben der einzelnen Probanden innerhalb der 3 Aufbereitungsstufen und die errechneten Durchschnittswerte

„Streuung“ der Molekulargewichte (kleinster / größter Wert (kDa)) der separierten Speichelproben aller Probanden														
Proband	1		2		3		4		5		6		Ø	
	von	bis												
Vollspeichel pur mit 2-fach Lämmli	12,81	269,7	9,78	293,3	9,84	275	10,21	291,7	9,75	271,7	10,17	266,7	10,42	278
Vollspeichel ultrazentrifugiert mit 2-fach Lämmli	9,97	235	9,93	238,3	12,54	169,9	12,29	278,3	9,42	275	10,3	278,3	10,74	245,8
Vollspeichel ultrazentrifugiert, nach TCA-Fällung mit 2-fach Lämmli	9,39	293,3	10,13	281,7	10,04	276,7	10,17	283,3	10,25	276,7	10,43	281,7	10,06	282,2



Diag. 24: „Streuung“ der Molekulargewichte (kDa) der separierten Speichelproben gemittelt über alle Probanden für die einzelnen Aufbereitungsschritte

### 4.8 Statistische Auswertung

Die Elektropherogramme wurden in 16 Molekulargewichtsintervalle eingeteilt und die Anzahl der Banden innerhalb der jeweiligen Intervalle gezählt, so dass sich 16 diskrete Variablen als Zielgrößen ergaben.

Die Variablen waren nicht „Poisson“-verteilt, da empirischer Mittelwert und empirische Varianz stark voneinander abwichen. Die Annahme der Normalverteilung war gerechtfertigt.

#### 4.8.1 Analyse der Einflussvariablen

##### 4.8.1.1 Geschlecht

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Probanden.

Die Mittelwerte der Gesamtbandenanzahlen lagen bei 42,1 vs. 42 (t-Test,  $p=0,83$ ).

##### 4.8.1.2 Lokalisation

Die Einzelanalyse der 16 Intervalle ergab, dass bei 11 Intervallen mehr Banden bukkal als palatinal, und bei 5 Intervallen mehr Banden palatinal als bukkal gefunden wurden. Dadurch zeigte sich eine Tendenz zu höheren Bandenanzahlen auf bukkalen Lokalisationen als auf palatinalen, aber ohne statistische Signifikanz.

##### 4.8.1.3 Zeit

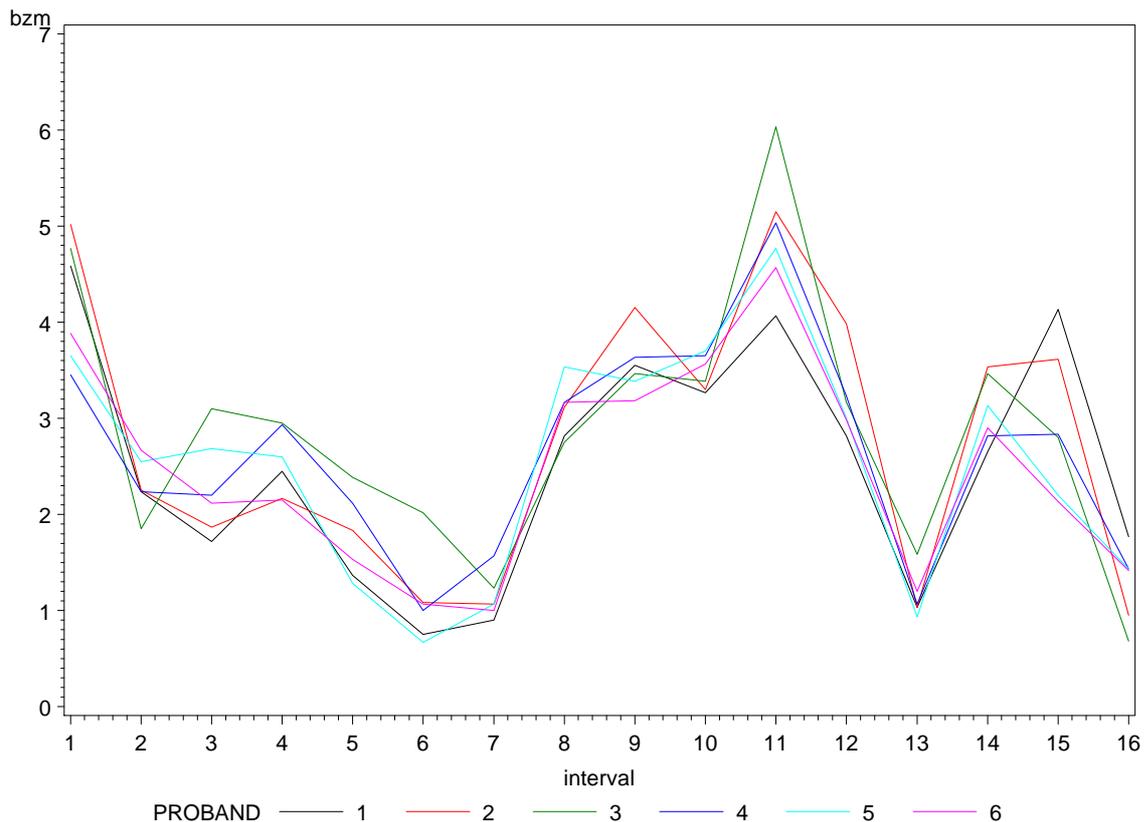
Da die Probenentnahme der 3 verschiedenen Expositionszeiten zu unterschiedlichen Zeiten erfolgte, konnte man von unabhängigen Messungen ausgehen. Die Gesamtbandenanzahl zeigte einen unabhängigen Effekt, d.h. mit zunehmender Expositionsdauer nahm auch die Anzahl der Banden zu (ANOVA,  $p\leq 0,001$ ).

Bei der Einzelanalyse zeigten aber nur die Intervalle 9 (50 - 40 kDa), 10 (40 - 30kDa) und 13 (20 - 15 kDa) einen signifikanten Effekt (Scheffé-Test).

Folgerung: Die Daten werden nach Geschlecht, Lokalisation und Zeit aggregiert, d.h. es wurden Mittelwerte für die 16 Variablen (Intervalle) gebildet.

## 4. Ergebnisse

Anschließend wurde eine MANOVA durchgeführt (die Faktoren Material und Proband waren ohne Wechselwirkung). Ergebnis war, dass es innerhalb der Materialien keine signifikanten Unterschiede gab, sondern nur Tendenzen innerhalb der Intervalle 3 (120 - 100 kDa), 11 (30 - 25 kDa) und 15 (<10 kDa) (Scheffé-Test n.s.). Der Faktor „Proband“ erwies sich als signifikant ( $p \leq 0,001$ ), siehe Diagramm 25.

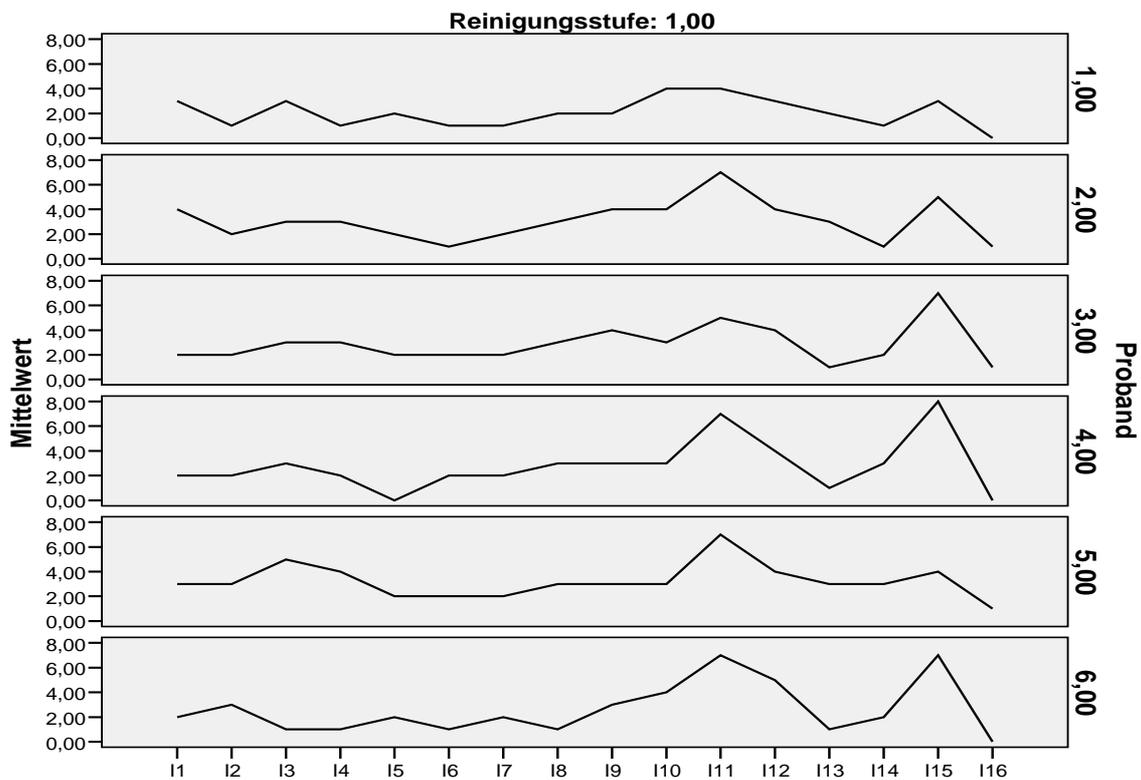


Diag. 25: Mittlere Bandenzahl (bzm) je Proband innerhalb der 16 Molekulargewichtsintervalle

Abschließend wurde die Bandenverteilung auf allen Werkstoffen mit der auf den Schmelzprüfkörpern als Referenz verglichen. Dazu wurden für alle 16 Intervalle und alle Materialien, mit Ausnahme von Schmelz, die jeweils nach Proband, Zeit und Lokalisation passenden Werte von denen des Schmelzes subtrahiert und anschließend nach Geschlecht, Lokalisation und Zeit aggregiert. Für die sich ergebenden Differenzen wurde dann eine MANOVA durchgeführt (Faktoren, Material und Proband ohne Wechselwirkung). Es ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede bei den Materialien, sondern nur Tendenzen innerhalb der Intervalle 13 (20 - 15 kDa) und 15 (<10 kDa) (Scheffé-Test n.s.). Der Faktor Proband war wiederum signifikant ( $p \leq 0,001$ ).

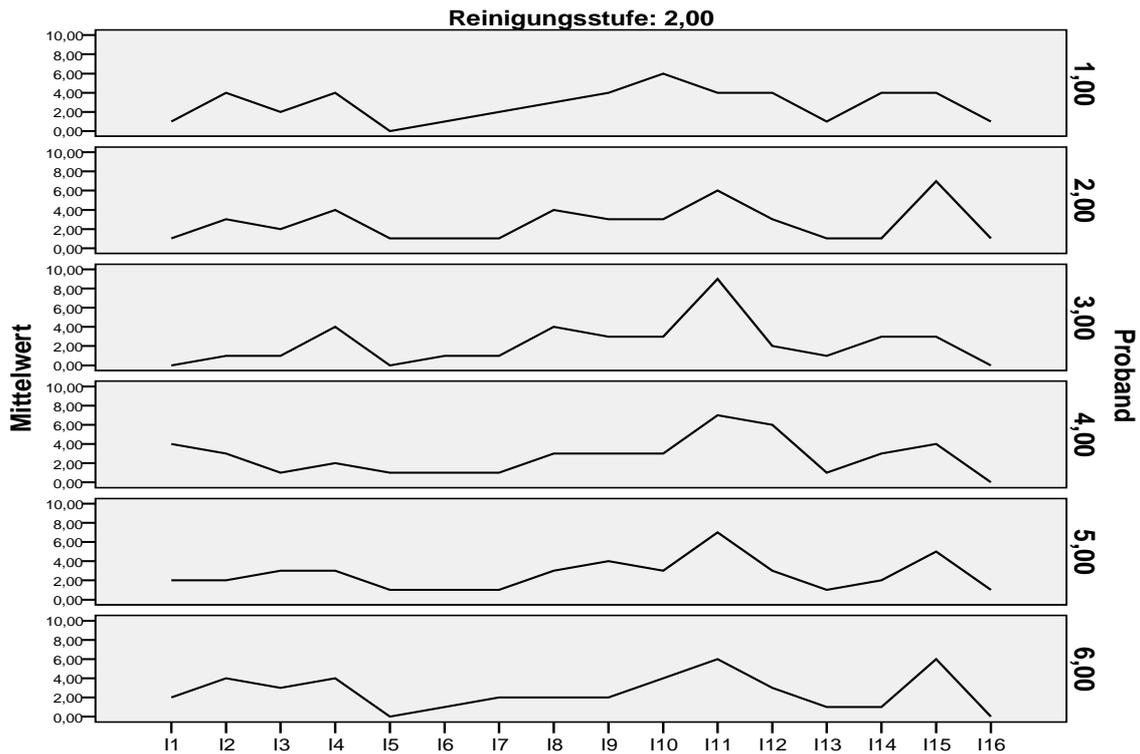
### 4.8.2 Auswertung der Vollspeichelproben

Nach Auswertung und Gegenüberstellung der Werte für die Bandenanzahlen innerhalb und zwischen den 3 Reinigungsstufen und dem Vergleich mit den Mittelwerten aus den Werkstoffproben ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied, man kann also davon ausgehen, dass der Proteingehalt weitgehend gleich ist. Man kann daraus schließen, dass sich nahezu alle im Vollspeichel enthaltenen Proteine auch innerhalb der Pellikel auf den Werkstoffproben wieder finden (Diag. 26 – 34).

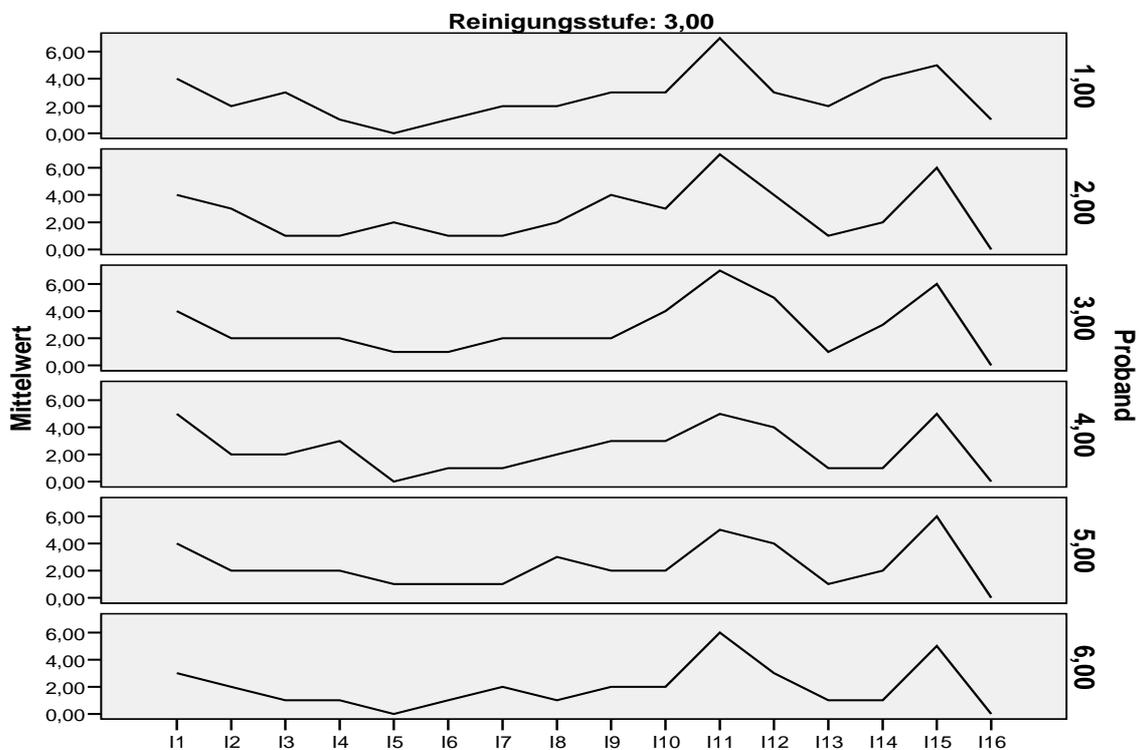


Diag. 26: Mittelwerte der detektierten, elektrophoretisch separierten Bandenanzahl der Speichelproben der einzelnen Probanden (1 bis 6) innerhalb der 16 Molekulargewichtsintervalle. **Aufbereitungsstufe 1** (Speichel pur mit 2-fach-Lämmli)

## 4. Ergebnisse

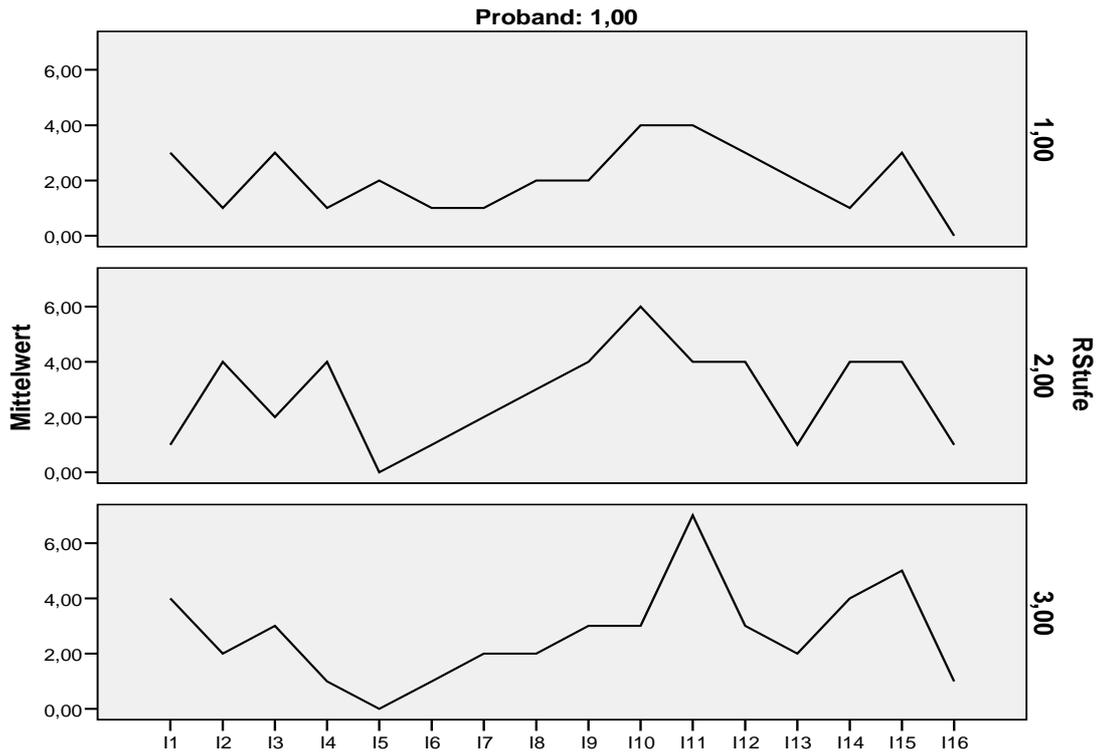


Diag. 27: Mittelwerte der detektierten, elektrophoretisch separierten Bandenanzahl der Speichelproben der einzelnen Probanden (1 bis 6) innerhalb der 16 Molekulargewichtsintervalle. **Aufbereitungsstufe 2** (Speichel pur ultrazentrifugiert mit 2-fach-Lämmli)

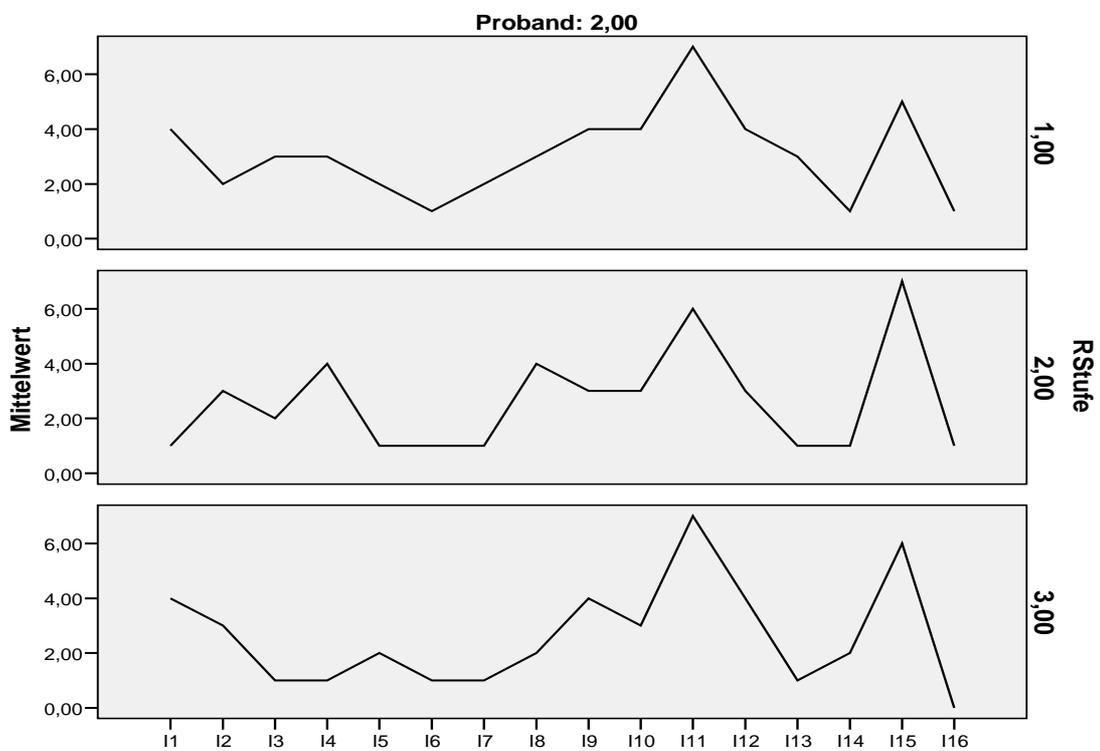


Diag. 28: Mittelwerte der detektierten, elektrophoretisch separierten Bandenanzahl der Speichelproben der einzelnen Probanden (1 bis 6) innerhalb der 16 Molekulargewichtsintervalle. **Aufbereitungsstufe 3** (Speichel pur ultrazentrifugiert, TCA-Fällung mit 2-fach-Lämmli)

## 4. Ergebnisse

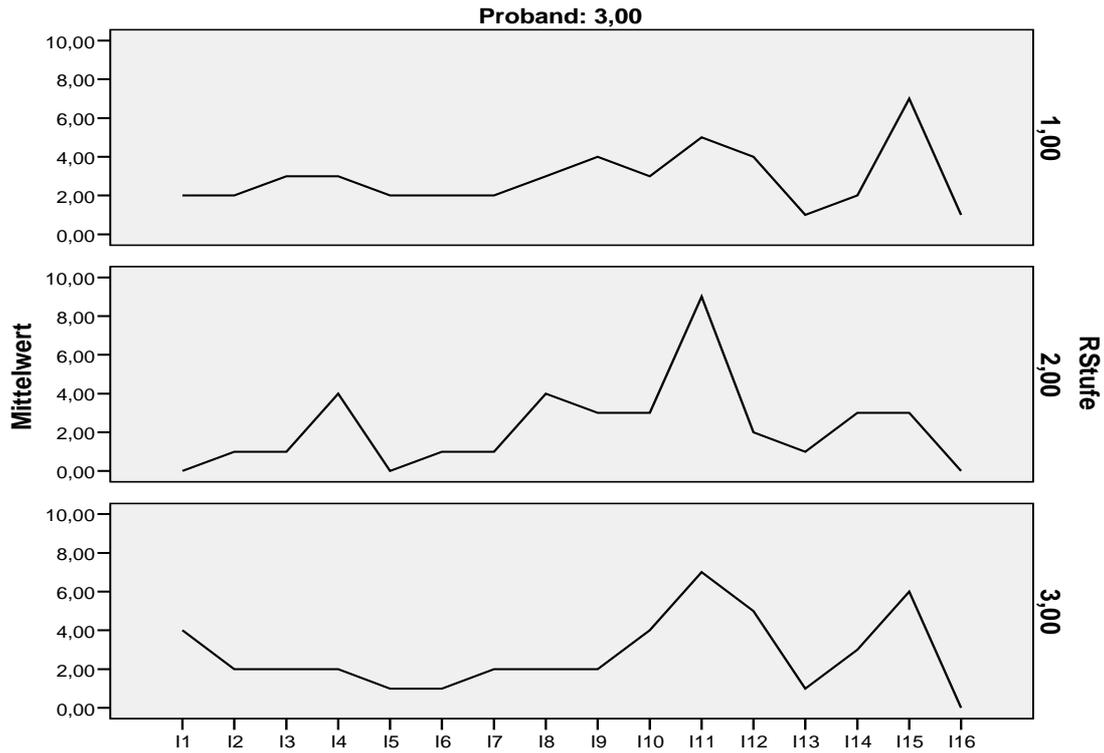


Diag. 29: Mittelwerte der detektierten, elektrophoretisch separierten Bandenanzahl der Speichelproben **Proband 1** innerhalb der 16 Molekulargewichtsintervalle und der 3 Aufbereitungsstufen.

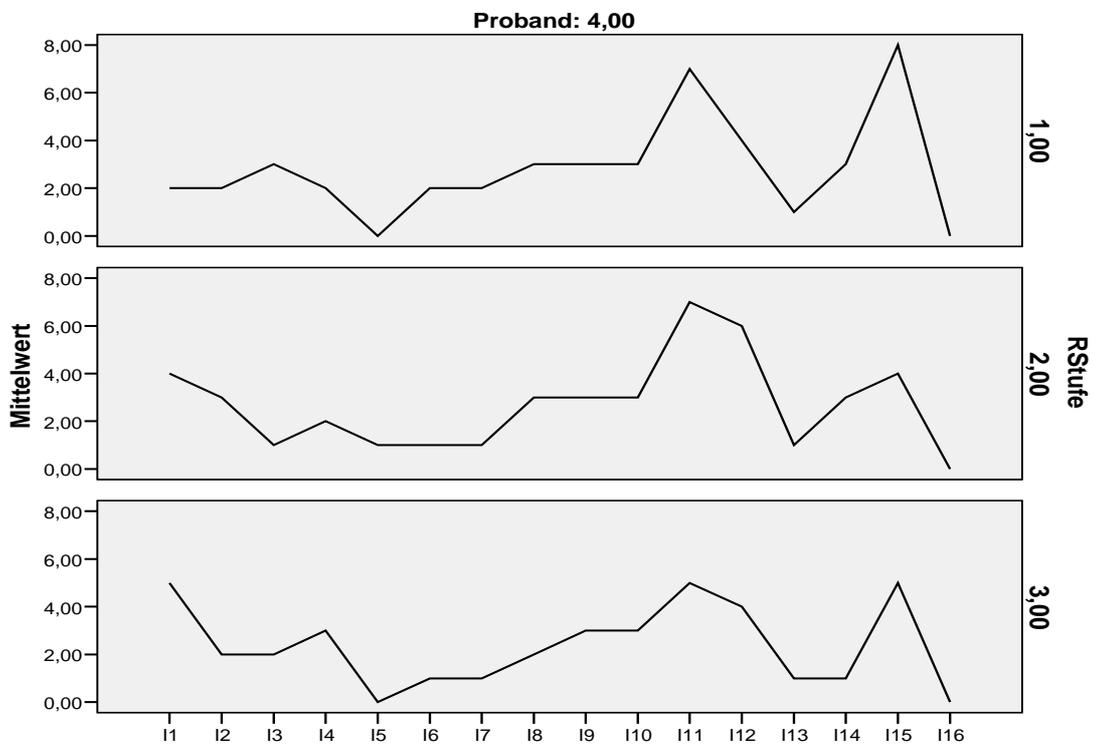


Diag. 30: Mittelwerte der detektierten, elektrophoretisch separierten Bandenanzahl der Speichelproben **Proband 2** innerhalb der 16 Molekulargewichtsintervalle und der 3 Aufbereitungsstufen.

## 4. Ergebnisse

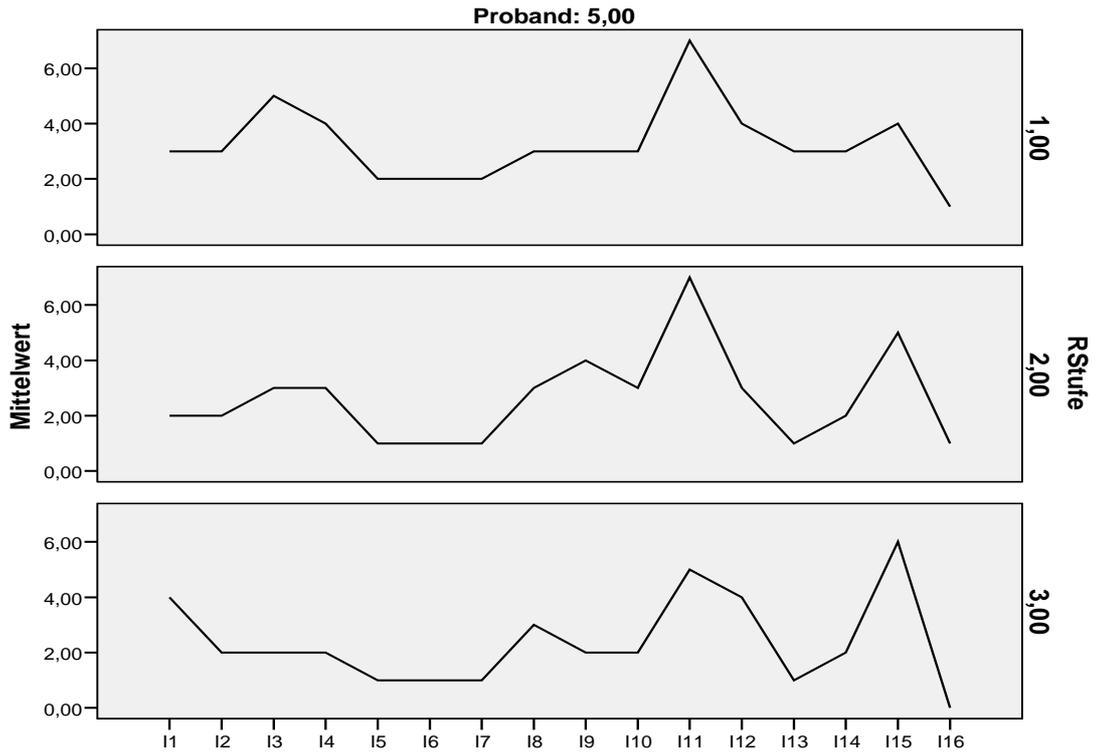


Diag. 31: Mittelwerte der detektierten, elektrophoretisch separierten Bandenanzahl der Speichelproben **Proband 3** innerhalb der 16 Molekulargewichtsintervalle und der 3 Aufbereitungsstufen.

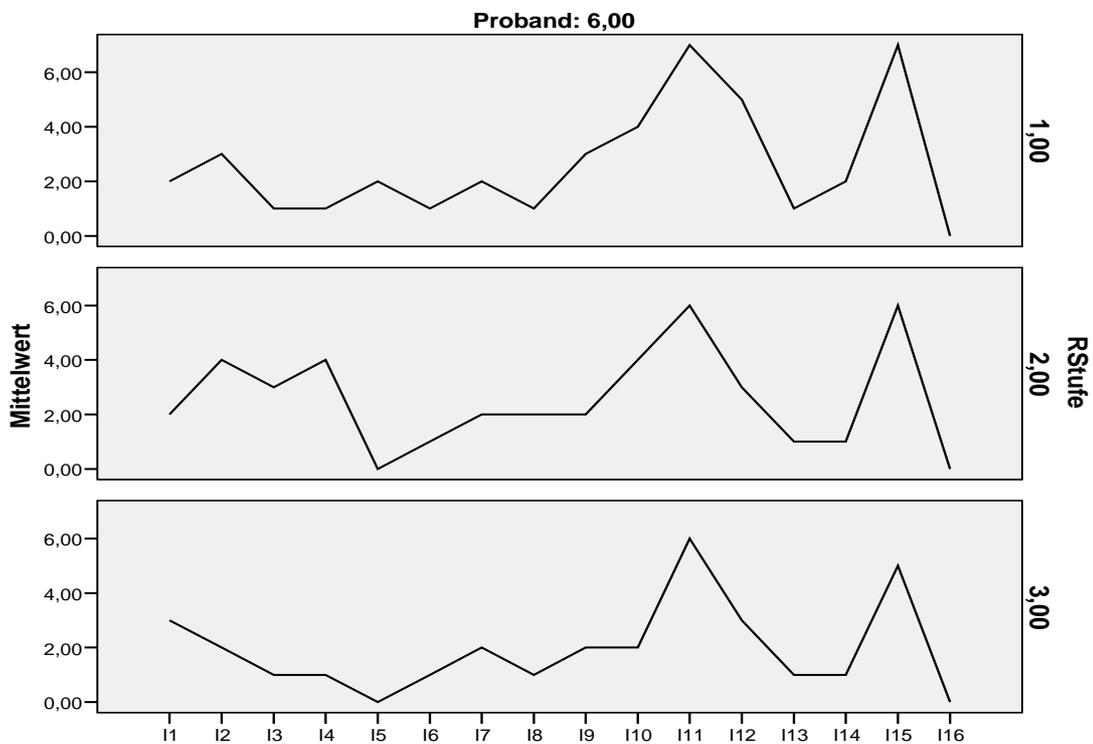


Diag. 32: Mittelwerte der detektierten, elektrophoretisch separierten Bandenanzahl der Speichelproben **Proband 4** innerhalb der 16 Molekulargewichtsintervalle und der 3 Aufbereitungsstufen.

## 4. Ergebnisse



Diag. 33: Mittelwerte der detektierten, elektrophoretisch separierten Bandenanzahl der Speichelproben **Proband 5** innerhalb der 16 Molekulargewichtsintervalle und der 3 Aufbereitungsstufen.



Diag. 34: Mittelwerte der detektierten, elektrophoretisch separierten Bandenanzahl der Speichelproben **Proband 6** innerhalb der 16 Molekulargewichtsintervalle und der 3 Aufbereitungsstufen.

### 4.8.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es ließen sich keine allgemeingültigen Unterschiede hinsichtlich Bandenanzahl, -verteilung und Molekulargewichten innerhalb der einzelnen Werkstoffe feststellen. Muster und Verteilung der Banden waren innerhalb der Probanden signifikant verschieden ( $p \leq 0,001$ ).

Innerhalb der beiden Lokalisationen waren tendenzielle Unterschiede zu erkennen, diese waren jedoch nicht signifikant.

Die Bandenanzahl nahm mit zunehmender intraoraler Expositionszeit (Pellikelbildungszeit) signifikant zu ( $p \leq 0,001$ ).

Bandenmuster, -anzahl und Molekulargewichte der Schmelzproben als Referenz zu den übrigen Proben ergaben keine signifikanten Unterschiede, lediglich der Faktor Proband war wiederum signifikant ( $p \leq 0,001$ ).

Innerhalb eines Individuums gab es Unterschiede bezüglich der Werkstoffe, Lokalisationen und Zeiten. Diese glichen sich aber bei der Gesamtbetrachtung aller Probanden wiederum aus.

Es gab z. T. große intra- und interindividuelle, jedoch keine auf bestimmte Werkstoffe allgemeingültig zu beziehenden Unterschiede.

Innerhalb der unterschiedlichen Reinigungsstufen der Vollspeichelproben und auch im Vergleich der Bandenanzahl mit denen der Werkstoffproben waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Es kann davon ausgegangen werden, dass die im Speichel enthaltenen Proteine auch in der auf den Werkstoffoberflächen gebildeten Pellikel enthalten sind, und die Proteinadsorption daher nicht mehr als selektiver Prozess bezeichnet werden kann.

## 5. Diskussion

### 5.1 Material und Methoden

#### 5.1.1 Prüfkörperherstellung

In der vorliegenden Studie zur biochemischen Untersuchung der initialen Bioadhäsionsprozesse auf Festkörperoberflächen in der Mundhöhle sollte ein möglichst repräsentativer Querschnitt dentaler Restorationswerkstoffe einschließlich vergleichender Referenzmaterialien zum Einsatz kommen. Neben einer Goldlegierung, Keramik, Prothesenkunststoff, Titan, Komposit, Amalgam und Glasionomerzement waren dies Glas, Teflon und Rinderschmelz, die, mit Ausnahme der bereits fertigen Prüfkörper, welche nur noch zurechtgeschnitten werden mussten, exakt nach Herstellerangaben analog der klinischen Verarbeitungsweise hergestellt wurden.

Um die Biopolymeradsorption an unterschiedlichen Materialien auf möglichst einheitlichem Oberflächenrelief untersuchen zu können, wurden alle Prüfkörper mit Nassschleifpapier der Körnung „4000“ poliert und einer intensiven Reinigung unterzogen. Titan erwies sich dabei als besonders schlecht polierbar, die Oberflächentextur war nicht immer als hochglänzend zu betrachten.

Die vor jedem neuen Trageversuch unabdingbar notwendige restlose Entfernung aller Biofilmanlagerungen von der Probenoberfläche erfolgte jeweils durch erneute Nasspolitur und anschließende Ultraschallreinigung.

Zum Ausschluss der antibakteriellen Eigenschaften, die Materialien wie Glasionomerzement, Amalgam, Komposit und Kunststoff unmittelbar nach der Verarbeitung für einige Tage aufweisen (Nunez et al. 1976, Meryon und Johnson 1989), wurden die entsprechenden Prüfkörper erst nach mindestens 7-tägiger Lagerung für die intraoralen Expositionsversuche eingesetzt. Die Lagerung von Glasionomerzement erfolgte überdies bei 100%iger Luftfeuchtigkeit.

Die Schmelz-Referenzprüfkörper stammten aus extrahierten Frontzähnen frisch geschlachteter Rinder. Esser et al. (1998) stellten dazu fest, dass Rinderschmelz zu Humanschmelz hinsichtlich seiner chemischen Zusammensetzung, seiner Wärmekapazität und Dichte sehr gut vergleichbar sei. Phosphat-, Kalzium- und Magnesiumgehalt seien bei bovinem und humanem Schmelz fast identisch und der

chemische Aufbau annähernd gleich (Davidson et al. 1973). Bislang konnte kein Unterschied hinsichtlich der Biopolymeradsorption zwischen den beiden Schmelzarten festgestellt werden (Hannig M 1998).

### **5.1.2 Die partielle Miniplastschiene als Prüfkörperträger**

Zur Durchführung nichtinvasiver intraoraler Expositionsversuche stellt die partielle Miniplastschiene ein ideales Trägermedium dar. Sie eignet sich für mehrfach exakt reproduzierbare Positionierungen von Prüfkörpern, insbesondere auch bei längerfristigen Studien, und die anschließende extraorale Gewinnung der Pellikel (Tinanoff 1976 a, b, c, Adams et al. 1979). Die zur Desorption der Pellikel notwendigen, aber intraoral nicht anwendbaren Lösungen wie z.B. SDS oder wie in anderen Studien auch EDTA, können somit zur chemo-mechanische Gewinnung eingesetzt werden.

Mac Pherson et al. (1991) konnten belegen, dass sich bei auf Schienen getragenen Schmelzprüfkörpern ein den natürlichen Schmelzoberflächen vergleichbares Plaqueökosystem bildet.

Durch den Verzicht auf kritisch zu beurteilende intraorale Befestigungszemente kann die Gefahr der Adsorption von gelösten Ionen und Makromolekülen auf Prüfkörperoberflächen durch die initiale Speichellöslichkeit der Zemente vermieden werden, was den direkten Vergleich der Adsorptionsprozesse auf verschiedenen Materialien sonst erschweren würde.

Daneben beeinträchtigt die Schiene das marginale Parodont nicht, so dass inhaltliche Bestandteile der Sulkusflüssigkeit weiterhin ungehindert für die Biopolymeradhäsion zur Verfügung stehen können. Durch die Gaumenfreiheit kann die Speichelsekretion der Glandulae palatinae ungehindert stattfinden.

Die Prüfkörper sind leicht und ohne Beschädigung der Pellikel von der Trägerschiene entfernbar.

Vor jedem Trageversuch wurden die bestückten Schienen für 24 Stunden in destilliertem Wasser kühl gelagert, was z.B. die antibakteriellen Eigenschaften von Kunststoffen deutlich reduziert (Ørstavik und Hensten-Pettersen 1978).

### 5.1.3 Versuchsbedingungen während der intraoralen Exposition

Zur vergleichenden Bewertung der einzelnen Versuche mussten alle die Pellikelbildung beeinflussenden und möglicherweise modifizierenden Faktoren minimiert werden. Aus früheren Untersuchungen ist der Einfluss der Nahrung und ihrer Bestandteile auf die Zusammensetzung der Pellikel bekannt (Rykke und Sønju 1991, Schüpbach et al. 1996). TEM-Untersuchungen belegen, dass adsorbierbare Nahrungsbestandteile zu Veränderungen in der Pellikelmorphologie führen können. Fettreiche Milchprodukte führen zu Lipideinschlüssen in der Pellikel (Nyvad und Fejerskov 1984). Während der Einnahme von 100 g Saccharose pro Tag konnte Müller (1987) eine verstärkte Pellikelbildung beobachten. Während der intraoralen Versuchszeiten war daher in der vorliegenden Studie jegliche Aufnahme von Nahrung und Getränken untersagt.

Bei allen Probanden wurden Alkohol-, Nikotin- und Medikamenteneinnahme, spezielle Ernährungsgewohnheiten, Erkrankungen, insbesondere auch die der Speicheldrüsen, Karies, Parodontitiden und Mundschleimhauterkrankungen anamnestisch ausgeschlossen.

30 Minuten vor dem Einsetzen der Schienen sollte eine intensive Zahnreinigung durch den Probanden selbst unter Verwendung von Wasser, Zahnbürste, Zahnseide ohne Zusätze und ggf. Interdentalbürstchen durchgeführt werden. Der Einsatz von Zahncreme und Spüllösungen war nicht gestattet, abschließend wurde die Mundhöhle dreimal gründlich mit Wasser ausgespült. Ab diesem Zeitpunkt herrschte absolute Nahrungskarenz.

Die Pellikelbildung unterliegt starken regionalen Unterschieden (Carlén et al. 1998, Hannig M 1998, 1999, 1997), daher wurden die Prüfkörper immer an den gleichen Lokalisationen platziert, um den lokal disponierenden Faktoren von Speichelfluss, Speichelzusammensetzung und abrasiv-desorptiven Einflüssen Rechnung zu tragen (Hannig M und Joiner 2006, Sønju Clasen et al. 2000).

Die Pellikelbildung und die Speichelzusammensetzung unterliegen einem zircadianen Rhythmus (Morge et al. 1989). Da die vorliegende Studie die generelle Proteinadsorption auf Festkörperoberflächen untersuchte, wurden für die Versuchszeiten keine Vorschriften erlassen, die Expositionsversuche wurden aber überwiegend vormittags durchgeführt.

### 5.1.4 Einfluss probandenspezifischer Faktoren auf die Pellikelbildung

Jeder Mensch produziert seinen spezifischen individuellen Speichel mit variierenden Mengen der einzelnen Inhaltsstoffe. Die Vermutung, dass auch die Pellikel individualspezifische Charakteristika aufzeigt, konnte in der vorliegenden Studie anhand der Bandenmuster anschaulich belegt werden. Es nicht verwunderlich, dass man keine Unterschiede innerhalb der Proteinzusammensetzung der Pellikel verschiedener Probanden gefunden hat, wenn man spezifische, die Pellikelzusammensetzung beeinflussende Faktoren von vornherein ausgeschlossen hat, die individuell spezifischen Unterschiede in der Speichelzusammensetzung nur in geringsten Mengen vorliegen und diese somit keinen Einfluss auf die Aminosäurezusammensetzung haben können. Rykke et al. (1990) konnten z.B. weder intra- noch interindividuelle Unterschiede der Aminosäurezusammensetzung der 2-Stunden-Pellikel innerhalb einer 2-Jahres-Studie feststellen. Rüdiger et al. fanden 2002 heraus, dass durch die stark erhöhte Sulcusfließrate bei parodontalen Entzündungen die Plasmabestandteile in der Pellikel deutlich erhöht sein können. Slomiany et al. entdeckten schon 1986, dass kariesaktive und kariesinaktive Personen Unterschiede in der Lipidzusammensetzung aufweisen. Die unterschiedliche Speichelzusammensetzung von Enzymen, Immunglobulinen und Blutgruppenbestandteilen führt zu charakteristischen Unterschieden der individuellen Pellikel (Kraus et al. 1973, Ørstavik und Kraus 1973, 1974, Kraus und Mestecky 1976, Rølla et al. 1983, Levine et al. 1985, Al-Hashimi und Levine 1989). Auch fett- bzw. kohlenhydratreiche Ernährung (Nyvad und Fejerskov 1984, Müller 1987) verändern, wie oben schon beschrieben, die Pellikel. Ebenso würden Verletzungen innerhalb der Mundschleimhaut, sowie Erkrankungen, speziell die der Speicheldrüsen oder die Beeinflussung der Speichelsekretion durch Medikamenteneinnahme, die Zusammensetzung der Pellikel beeinträchtigen. Rykke und Sønju (1991) und Schüpbach et al. (1996) zeigten die Veränderungen im ultrastrukturellen Aufbau und der biochemischen Zusammensetzung der Pellikel durch Nahrungsaufnahme während des Pellikelwachstums. Auch die Tageszeit (Morge et al. 1989) und die Lokalisation innerhalb der Mundhöhle (Quirynen und Van Steenberge 1989, Quirynen et al. 1991) spielen eine beeinflussende Rolle, wobei der Einfluss der Tageszeit als einziger Punkt in der vorliegenden Studie nicht eingehalten wurde.

### 5.1.5 Einfluss der Tageszeit und der Maturation auf die Pellikelbildung

Die Zusammensetzung des Speichels unterliegt einem zircadianem Rhythmus.

Morge et al. (1989) untersuchten mittels Kontaktwinkelmessung die Auswirkungen auf die Pellikelbildung auf Prüfkörpern aus PMMA, Amalgam und Goldlegierung zu unterschiedlichen Tageszeiten (8 Uhr, 12 Uhr und 16 Uhr). Die 12 Uhr-Pellikel zeigten im Vergleich zu den zu anderen Zeiten gebildeten Biofilmen die geringsten Kontaktwinkeländerungen. Die Erklärung scheint darin zu bestehen, dass anorganische Phosphate eine zircadiane Variation zeigen. Es ist bekannt, dass diese einen inhibitorischen Effekt auf die Adsorption von Speichelproteinen auf Hydroxylapatit (Pearce und Bibby 1966) und Zahnschmelz (Leach 1980) besitzen.

Hannig M (1999) konnte durch transmissionselektronenoptische Untersuchungen auf *in vivo* über einen Zeitraum von 24 Stunden getragenen unterschiedlichen Prüfkörpern zeigen, dass die Dicke der Pellikel kontinuierlich zunahm und das mikromorphologische Erscheinungsbild vor allem auf bukkalen Prüfkörpern deutlichen zeitabhängigen Veränderungen unterlag. Nach 2- bzw. 6-stündiger Tragezeit wiesen die Pellikel eine sehr heterogene und variable Struktur auf, nach 24 Stunden wandelten sich diese zu einer homogenen granulären bzw. feinglobulären Schicht, was die kontinuierlichen Komplettierungs- und Reifungsprozesse der Proteinzusammensetzung und – konformation in den adsorbierten Biopolymerschichten widerspiegelt (Mayhall 1970, 1975, 1977, Sønju und Rølla 1973, Hay und Moreno 1979, Bennick et al. 1983, Embery et al.1986).

Bennick et al. (1983) berichteten von einer starken Zunahme der sauren PRP`s bis auf einen Anteil von 40% der Pellikelproteine innerhalb der ersten Stunde der Pellikelbildung. Ältere Pellikel enthalten hingegen nur noch 0,1% saure PRP`s, was auf Degradationsprozesse hinweist.

Auch die Elektrophoresegele der aktuellen Untersuchung zeigten, dass die Banden im niedrigen Molekulargewichtsbereich von 0 bis 15 kDa die größten Volumina hatten und zeitabhängig Veränderungen aufwiesen.

In der gereiften Pellikel kommen vermehrt hochmolekulare Muzine vor, die wahrscheinlich die vermehrte Adhäsion von *Streptokokkus mutans* bedingen (Gibbons et al. 1986). Diese Speichelbestandteile werden vermutlich aufgrund ihres höheren Molekulargewichtes langsamer als die anderen Proteine an die

Schmelzoberfläche adsorbiert, was zur Beeinträchtigung und Desorption bereits zuvor adsorbierter Proteine führen könnte (Pratt-Terpstra et al. 1989).

Mit zunehmender Reifung, Komplettierung und Festigung der Pellikel kommt es zu einer signifikanten Reduktion der Diffusionsprozesse an der Schmelzoberfläche (Zaharadnik et al. 1976), womit die Schutzfunktion gegen die Demineralisation durch die selektive Permeabilität zunimmt.

Ebenso wird eine zeitabhängige Metabolisierung von Pellikelbestandteilen durch die in der Plaque enthaltenen Mikroorganismen diskutiert (Leach und Saxton 1966, Armstrong und Hayward 1968, Hay 1969, Tinanoff et al. 1976 b, c). Bestimmte Speichelproteine dienen oralen Streptokokken als Wachstumsfaktoren (Cowman et al. 1979, 1981, De Jong und Van der Hoeven 1987) und werden nach der Adsorption durch extrazelluläre mikrobielle Enzymkomplexe abgebaut (Leach 1963, Leach und Critchley 1966).

### 5.1.6 Einfluss der Lokalisation auf die Pellikelbildung

Innerhalb weniger Sekunden setzt die Adsorption von Speichelproteinen auf Festkörperoberflächen ein (Baier 1977, Glantz 1980, Ericson et al. 1982, Horbett 1982). Die Pellikel ist als omnipräsente organische Struktur zu bezeichnen, die sich auf allen in die Mundhöhle eingebrachten organischen und anorganischen Festkörperoberflächen ausbildet (Hannig M 1998).

Die Ergebnisse früherer Studien weisen auf keinerlei lokalisationsabhängige Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung der *in vivo* gebildeten Pellikel hin. Veerman et al. (1996) konnten eine unterschiedliche Zusammensetzung des Parotisspeichels im Vergleich zu dem der Glandulae submandibulares und sublinguales aufzeigen.

Inwieweit diese unterschiedlichen Zusammensetzungen sich auch auf das lokal differierende Angebot an Speichelbiopolymeren auswirkt, hängt von der Durchmischung der einzelnen Speichelsekreten ab. Beeinflussende Faktoren sind Zungen- und Schluckaktivität, Bewegungen der mimischen Muskulatur und reizbedingte Erhöhungen der Speichelsekretion.

Sas und Dawes (1997) konnten zeigen, dass sich die Speichelvermischung nur sehr langsam vollzieht und nicht in allen Bereichen der Mundhöhle gleichermaßen stattfindet.

Carlén et al. (1998) konnten eine lokalisationsabhängige Pellikelzusammensetzung in Bezug auf einzelne Proteine mittels immunologischer Verfahren nachweisen.

Hannig M (1998) konnte zeigen, dass das ultrastrukturelle Erscheinungsbild der Pellikel in Abhängigkeit von der Lokalisation ausgeprägte Unterschiede aufwies und die Art des adsorbierenden Werkstoffes dabei keine Rolle spielte. Vor allem palatinale Prüfkörperoberflächen, die der abrasiven Zungenbewegung unterlagen, bildeten meist nur eine 10 bis 20 nm messende Pellikel aus, wohingegen auf bukkalen Oberflächen bis zu 1000 nm dicke Strukturen anzufinden waren, was indirekt auch in der vorliegenden Studie durch die tendenziell geringere Bandenzahl auf palatinal getragenen Prüfkörpern, die geringeren Bandenvolumina und die schwächere Färbungsintensität der palatinalen Proteinbanden bestätigt werden konnte. Dies belegt die untergeordnete Bedeutung der materialspezifischen Faktoren für die initialen Bioadhäsionsprozesse. Werkstoffspezifische Unterschiede waren nur äußerst selten nachweisbar. Auch in der vorliegenden Studie konnten keine statisch signifikanten materialspezifischen Unterschiede ermittelt werden. Für Hannig M (1997, 1998) scheint das Konzept der selektiven Adsorption spezifischer Glykoproteine an der Festkörperoberfläche in diesem Zusammenhang nicht weiter aufrecht erhalten werden zu können. Glantz (1980) bemerkte dazu, dass sich die Benetzung der Festkörperoberflächen durch die im Speichel gelösten Glykoproteine derart schnell vollziehe, dass von einer primären Selektivität der Adhäsion nur begrenzt gesprochen werden kann. Dies wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie untermauert (siehe 3-min-Gele). Intraorale Bioadhäsionsprozesse werden vermehrt durch unspezifische Interaktionen zwischen Speichel und Festkörperoberfläche bestimmt (Glantz 1980).

### 5.1.7 Methodik zur Pellikelgewinnung und -aufbereitung

In der vorliegenden Studie wurde die von Carlén et al. (1998) beschriebene chemo-mechanische Methode zur Abgewinnung der Proteinschicht von den verschiedenen Prüfkörperoberflächen benutzt. Dabei wurden die Prüfkörper nach der entsprechenden intraoralen Expositionszeit zunächst mit destilliertem Wasser abgespült, vorsichtig mit Druckluft getrocknet und von den Trägerschienen entnommen. Anschließend wurde die Oberfläche mit SDS getränkten Schwämmchen unter sehr hohem Anpressdruck abgerieben und mit trockenen Schwämmchen nachgewischt.

Mittels Lämmli-Puffer und Zentrifugation wurden die Proteine aus den Schwämmchen herausgetrennt und abschließend für 1,5 Minuten bei 95°C denaturiert. Eine längere Kochzeit bei höheren Temperaturen würde neben der Proteindenaturierung auch zu einer Zerstörung der Proteine führen. In den abzentrifugierten Schwämmchen konnten oft kleine, vom Lämmli-Puffer blau gefärbte Reste beobachtet werden, die sich auch mit nochmaliger Benetzung und längerer Zentrifugation nicht vollständig herauslösen ließen. In diesen „Zweitzentrifugaten“ zeigte sich ein im Vergleich zu den zuerst gewonnenen Proben ähnliches, aber schwächer ausgeprägtes elektrophoretisches Bandenmuster. Dies ähnelt den Beobachtungen von Carlén et al. (1998), die bei einer erneuten Behandlung der Schwämmchen eine geringe Restproteinmenge finden konnten.

Hannig M et al. (2003) beschrieben die kombinierte Methode von SDS und EDTA, um die äußere Pellikel und die fester anhaftende Pellikelbasisschicht schrittweise zu gewinnen. Mittels SDS wurde erst selektiv die äußere, locker formierte globuläre Pellikelschicht abgelöst und anschließend dann mit EDTA die Pellikelbasisschicht gewonnen.

In Versuchen konnte gezeigt werden, dass mit der alleinigen SDS-Schwämmchen-Methode nicht die gesamte Proteinschicht von Schmelzprüfkörpern desorbiert werden konnte, erst durch den kombinierten Einsatz von SDS und EDTA konnte auch die Basisschicht gewonnen werden (Hannig M et al. 2005).

In der vorliegenden Studie kam nur die alleinige SDS-Schwämmchen-Methode zur Anwendung, da EDTA nur auf Schmelzprüfkörpern zur Proteindesorption eingesetzt werden kann. Es wurden keine Versuche bezüglich evtl. verbliebener Restproteine auf den Prüfkörpern nach erfolgter Pellikeldesorption durchgeführt. Die Ergebnisse

zeigten aber gegenüber allen anderen Methoden ein eindrucksvolles Proteinspektrum von 6,1 bis zu 334,37 kDa mit wesentlich mehr Banden, wobei sowohl nach oben als auch nach unten noch nicht aufgetrennte Bereiche zu vermuten waren.

Embery et al. (1986) entwickelten eine Methode zur schrittweisen Pellikelgewinnung von Schmelzoberflächen, bei der zunächst 2-molare Kalziumchloridlösung (chemische Desorption) und anschließend Küretten (mechanische Abgewinnung) zum Einsatz kamen. Sie fanden in der zuerst gewonnenen Schicht vor allem hochmolekulare und in der zuletzt desorbierten Basisschicht hauptsächlich niedermolekulare Proteine.

Das starke Detergens SDS löst neben den Pellikelproteinen auch Membranen von Mikroorganismen und Epithelzellen, so dass auch die darin enthaltenen Proteine in der Lösung enthalten sein könnten. In den umfangreichen elektronenoptischen Untersuchungen von Hannig M (1998), bei der die Pellikelbildung und die anschließende bakterielle Adhärenz auf verschiedenen Werkstoffoberflächen an unterschiedlichen Lokalisationen untersucht wurde, konnte gezeigt werden, dass die bakterielle Besiedlung in den meisten Fällen erst nach über 2-stündiger Expositionszeit erfolgte und nur in einigen Ausnahmefällen vereinzelte Kokken schon vor dieser Zeit adhärirten. Daher ist von einer größeren Verunreinigung der Pellikelproben durch bakterielle Proteine in der vorliegenden Studie nicht auszugehen. In den Speichelproben des Vergleichsgels, bei dem der Vollspeichel eines jeden Probanden in unterschiedlichen Reinigungsstufen analysiert wurde, kam SDS als Inhaltsstoff des Lämmli-Puffers zum Einsatz. Im Vollspeichel ist von einer bakteriellen Kontamination auszugehen. In der ersten Versuchsreihe wurde der Vollspeichel im reinen Zustand mit Lämmli-Puffer versetzt und aufgetragen. In der zweiten Reihe wurde der Vollspeichel zunächst ultrazentrifugiert und dann mit Lämmli-Puffer aufgetrennt. In dieser Lösung konnten dann keine Mikroorganismen oder Epithelzellen mehr enthalten sein. Nicht auszuschließen ist hierbei aber auch, dass durch die antibakterielle Enzymaktivität des Speichels schon bakterielle Proteine im Vollspeichel enthalten sein könnten.

Der Vergleich der 3 Reinigungsstufen untereinander und auch innerhalb der 6 Probanden brachte aber keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Proteinbanden, auch nicht im Vergleich mit den gefundenen Banden der separierten Proteinproben, die von den Werkstoffprüfkörperoberflächen gewonnen wurden.

### 5.1.8 Elektrophorese, Gelfärbung und Auswertung mit ImageMaster™ 1D

Die biochemische Zusammensetzung der Pellikel wurde häufig mittels chromatografischer Methoden untersucht (Armstrong 1967, Mayhall 1977, Öste et al. 1981, Al-Hashimi und Levine 1989, Rykke et al. 1990, Rykke und Sønju 1991, Sønju Clasen et al. 1997, Yao et al. 1999), womit aber nur eine begrenzte Analyse der Proteinzusammensetzung möglich war. Daher wurde schon seit Jahren in vielen Studien die Gelelektrophorese zur Proteinanalyse der Pellikel verwendet (Ruan et al. 1986, Al-Hashimi und Levine 1989, Jensen et al. 1992, Iontcheva et al. 1997, Carlén et al. 1998, Lee et al. 2001, Yao et al. 2001, Yao et al. 2003).

Die Vorversuche der vorliegenden Studie wurden mit dem PhastSystem™ der Firma Amersham Biosciences durchgeführt. Das PhastSystem™ ist eine vollautomatische Elektrophoreseapparatur mit integrierter Färbeeinheit, wie es z.B. in der Studie von Carlén et al. (1998) und Stigler et al. (2003) Anwendung fand. Das System ermöglicht die standardmäßige elektrophoretische Auftrennung und anschließende Gelfärbung von geringen Probenmengen (1 µl). In mehrjähriger intensiver Erprobung und Änderungen in allen erdenklichen Parametern wie z.B. unterschiedliche Gradientengele, Laufzeiten, Systemprogrammierungen, Probengewinnungen, Aufbereitung, Färbung, Chemikalien und mittels intensivem technischem Support usw., konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch kein einziges auswertbares Gel gewonnen werden. Alle Versuche erbrachten nur äußerst spärliche Proteinbanden (Abb. 46).



Abb. 46 PhastGel™ 4-15%

Legende: **M:** Rainbow-Marker®, **1 - 4:** Elektrophoretische Proteinauftrennung mit spärlichen Banden

Erst die Elektrophorese mittels selbst hergestellter 15%iger High-Tris-Gele erbrachte die hervorragenden Auftrennungen.

Bei optischer Betrachtung der Gele fielen in den Leerspuren, also den Streifen ohne Proteinbeladung, neben den Laufspuren horizontale Proteindiffusionen auf. Diese, wenn auch sehr schwach angefärbten Banden wurden von der Analysesoftware ImageMaster™ dennoch als reguläre Proteinbanden detektiert. Diese „Pseudobanden“ mussten manuell gelöscht werden. Bei der Betrachtung der Gelbereiche, in denen keine Banden sichtbar waren, tauchten bei intensiver Vergrößerung auch diese schwachen Linien auf, die von der Software als reguläre Banden erfasst wurden. Neben diesen Pseudobanden lagen in den Spuren anderer Proben in gleicher Höhe voluminöse Banden, so dass man hier eine mögliche horizontale Proteindiffusion in Erwägung ziehen könnte. Durch Verringerung der Detektionssensitivität der Software fielen nicht nur die besagten unerwünschten Banden weg, sondern auch andere, deutlich erkennbare Banden. Bei der Vielzahl der Banden in einem Gel war daher nie auszuschließen, dass Banden übersehen, bzw. „Pseudobanden“ mitgewertet wurden. Durch die gelelektrophoretische Auftrennung weniger Proben mit größerem horizontalem Abstand könnte dieser Effekt evtl. vermieden werden.

Bei der Gelbeladung mit der Mikroliter-Spritze wurden die verschiedenen Proben immer mit der gleichen Spritze in die flüssigkeitsgefüllten Geltaschen appliziert. Beim Hochziehen der Kanüle aus der Tasche war es nicht immer zu vermeiden, dass sich eine sichtbare blaue „Wolke“ applizierter Probenflüssigkeit über den Taschen bildete, wodurch die Gefahr der Kontamination der übrigen Taschen gegeben war. Ebenso könnte das mehrfache Ansaugen und Auspressen des Laufpuffers zur Spülung und Reinigung der Spritze nach der Probenapplikation zu einer Verunreinigung der Spritzeninnenwand durch evtl. anhaftende Proteine aus der Spüllösung führen. Das gezielte Auftrennen nur einer Probe pro Gel mit einer zuvor unbenutzten Spritze könnte Verunreinigungen ausschließen und die Präzision der vorliegenden Versuchsreihe überprüfen.

Aufgrund des kurvenförmigen Verlaufes der Elektrophoresebanden im Gel („Smile“-Effekt) konnten trotz „matching“ und Korrekturen keine eindeutigen Molekulargewichtsbestimmungen durchgeführt werden. Die Software wies sichtbar eindeutig gleichen Banden in unterschiedlichen Spuren bedingt durch den gekrümmten Verlauf differierende kDa-Werte zu. Selbst Unterschiede in nur einer

Nachkommastelle machen es der anschließenden statistischen Analyse unmöglich, Unterschiede im horizontalen Vergleich der Spuren durchzuführen. Daher konnte nur noch die absolute Bandenanzahl innerhalb bestimmter Intervalle zum Vergleich herangezogen werden. Hierbei geht evtl. entscheidendes Datenmaterial zur Erkennung einzelner fehlender oder vorhandener Banden bei unterschiedlichen Werkstoffen verloren.

Im oberen, gradientenbedingt stark gestauchten Einlaufbereich der Proben und in der Auslaufzone waren bei vergrößerter Betrachtung feine evtl. noch nicht aufgetrennte Banden zu beobachten. Die Auftrennung mittels Gelen anderer Gradienten könnten auch hier (oberhalb 220 kDa und unterhalb 10 kDa) weitere Banden hervorbringen.

Die nach den Versuchsreihen nicht verbrauchten Restproben wurden gepoolt und versuchsweise in einer 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierbei kamen hinter vielen Banden weitere Banden gleichen Molekulargewichts zum Vorschein, wobei es sich evtl. auch um Protein-Isoformen oder Abbauprodukte handelte.

Es wäre auch interessant, die gleiche Versuchsreihe mit Proben durchzuführen, die mittels der kombinierten SDS- und EDTA-Methode gewonnen wurden, um herauszufinden, ob tatsächlich mit der SDS-Methode nur die oberflächliche und nicht auch die Pellikelbasisschicht gewonnen werden kann.

Lohnendes Ziel sollte es auch sein, die entdeckten Banden z.B. mittels Antikörpernachweis bzw. Immuno-Blot eindeutig zu identifizieren.

Die Gele wurden zunächst zur Erfolgskontrolle einer Coomassiefärbung und anschließend einer Entfärbung unterzogen. Erst im zweiten Schritt erfolgte die Silberfärbung. Bei der Silberfärbung konnten wesentlich mehr und auch feinere Banden als bei der Coomassiefärbung zum Vorschein gebracht werden. Die Analyse der in den Banden enthaltenen Proteinmengen anhand der Pixelintensität, also des Schwärzungsgrades der Banden, wie in der Studie von Stigler et al. (2003) durchgeführt, ist aufgrund der unterschiedlichen Affinität der einzelnen Proteine zu den Silberionen nicht möglich. Dies kann nur durch die Coomassiefärbung ermittelt werden.

Die Resultate der manuellen Silberfärbung hingen ganz wesentlich von verschiedenen Faktoren ab, wie z.B. Einwirkzeit der Silbernitratlösung, Alter der angesetzten Lösungen, Alter und Menge des zur Entwicklung notwendigen Formaldehyds (bei angebrochenen Gebinden bildete sich am Boden

Paraformaldehyd). Bei längerer Entwicklungszeit mit mehr Formaldehyd konnten mehr Banden angefärbt werden bei gleichzeitig verstärkter Hintergrundfärbung, was die Qualität und Analysierfähigkeit erheblich beeinträchtigte.

### 5.1.9 Interpretation der Elektrophoresegele

Im Verlauf der Durchführung einer so umfangreichen und arbeitsintensiven Studie zur Proteinanalyse der *in vivo* gebildeten Pellikel gibt es, wie schon beschrieben, eine Vielzahl von möglichen Fehlerquellen mit bedeutsamen Auswirkungen auf die Ergebnisse. Ein weiteres Problem ist die Interpretation der Elektrophoresegele. Der optische Eindruck besticht durch eine unüberschaubare Vielzahl von Banden, die in unterschiedlich starker Ausprägung von Dicke und Färbung in nicht linear horizontaler Ausrichtung im Gel verlaufen. Eine exakte Detektierung aller Banden, ohne dabei einzelne zu übersehen oder „falsche“ Banden (z.B. Multimere Proteine, enzymatische Abbauprodukte von Proteinen, horizontal diffundierte Proteine von Nachbarspuren, Verunreinigungen oder verwischte Auslaufbereiche) mit zu erkennen, und anschließend allen gleichen Banden eindeutig richtig berechnete Molekulargewichte zuzuordnen, um letztendlich genau bestimmen zu können, ob die ein oder andere Bande, die einem bestimmten Protein zuzuweisen ist, die bei einzelnen Werkstoffen, Zeiten, Lokalisationen oder Probanden fehlt, war im Rahmen der vorliegenden Studie nicht möglich. Unter Umständen sind hierbei wertvolle Informationen in Ermangelung der geeigneten Auswertungsmöglichkeiten verloren gegangen.

Der optische Eindruck zeigt deutlich, dass die niedermolekularen Banden im Bereich von 0 bis 20, vereinzelt auch bis zu 40 kDa, meist als dicke und intensiv gefärbte Banden in Erscheinung treten, wobei auf den Substraten Teflon, Schmelz und auch Glas diese öfter fehlten und sich bei den palatinal getragenen Proben als insgesamt extrem schwach gefärbte Banden zeigten.

Die palatinalen Proben waren allgemein schwächer gefärbt. Bei einzelnen Probanden, Werkstoffen, Zeiten und Lokalisationen traten verschiedene Banden in unterschiedlichen Volumina und Färbungsintensitäten auf, was sich aber nicht generell bei einem Probanden bei den einzelnen Versuchen zeigte, sondern auch hier immer unterschiedlich ausfiel.

### 5.2 Ergebnisse

#### 5.2.1 Einfluss werkstoffspezifischer Faktoren auf Pellikelbildung und bakterielle Adhärenz

Proteine werden initial als einzelne Moleküle an der Festkörperoberfläche adsorbiert und bilden bei anwachsender Konzentrierung an der Oberfläche innerhalb von Sekunden homogene Filme oder Netzwerke aus (Rudee und Price 1985). Nur während dieser Initialphase der Biopolymeradsorption können die Menge der adsorbierten Proteine und das individuelle Adsorptionsmuster durch die spezifische Kombination von Werkstoffoberfläche und Protein beeinflusst werden (Rudee und Price 1985).

Van Dijk et al. (1988) stellten fest, dass die Antriebskraft des Proteinadsorptionsprozesses die Abnahme der freien Energie innerhalb des adsorbierenden Systems infolge von exothermen Reaktionen an der Grenzfläche ist. Ebenso spielen die Änderungen innerhalb der Zusammensetzung und der Konformation der adsorbierten Proteine bzw. – moleküle und die Reduktion der Grenzflächenenergie zwischen flüssiger und fester Phase dabei eine Rolle.

Die Koordination der Atome und Ionen an der Oberfläche metallischer oder keramischer Werkstoffe unterscheidet sich von der im Inneren dieser Werkstoffe. Im Inneren des Metall- bzw. Kristallgitters sind die Valenzen durch die Bindungen mit Nachbaratomen abgesättigt, an der Oberfläche stehen dagegen freie Valenzen zur Verfügung, die wiederum starke Anziehungskräfte auf die Adsorption von Makromolekülen ausüben (Baier et al. 1984, Engel 1986, Kasemo und Lausmaa 1986, Gristina et al. 1988).

Saubere Metalloberflächen weisen eine hohe Oberflächenenergie auf und besitzen eine hohe Reaktivität im Grenzflächenbereich, was die Adsorption von Biopolymeren begünstigt (Engel 1986).

Hannig M (1998) konnte auf Titanoberflächen im Vergleich zu Amalgam und Goldlegierung eine deutlich erhöhte Bildungsrate der bukkalen 2-Stunden-Pellikel feststellen.

Auch diese Feststellung konnte durch die aktuellen Ergebnisse untermauert werden. Bei allen Probanden fanden sich in den Laufspuren von Titanprüfkörpern nach 2-stündiger Tragezeit im Einzelfall bis zu 14 Banden mehr als bei Amalgam oder Gold.

Im Gegensatz zu den Oxidschichten auf Gold und Amalgam besitzen die entstehenden Titandioxide einen amphoteren Charakter (Boehm 1974), die eine Kationen- und Anionenaustauschreaktion ermöglichen. Dadurch können an Titanoberflächen Biopolymere sowohl über kovalente, als auch über ionische und Wasserstoffbrückenbindungen adsorbieren (Kasemo und Lausmaa 1986). In-vitro-Studien fanden im Gegensatz dazu heraus, dass auf Zahnschmelz eine höhere Adsorption als auf Titan stattfindet (Wolinsky et al. 1989, Kohavi et al. 1995, Steinberg et al. 1995).

Dies steht im Gegensatz zur den vorliegenden Ergebnissen. Hier sind nach 3 Minuten auf Schmelz zunächst weniger Banden als auf Titan und nach 2 Stunden in etwa gleich viele Banden zu finden.

Neben Metallen besitzen auch polymere Werkstoffe aufgrund ihrer nicht gebundenen Oberflächenvalenzen hohe Bindungskapazitäten für Speichelproteine. Durch die Lichtpolymerisation werden nur ca. 55 bis 70% der Monomere zahnärztlicher Komposite in Polymere überführt. Trotz der überwiegend hydrophoben Matrix verbleibt somit eine hohe Fähigkeit zur Proteinbindung. Die Konformationsänderungen von Proteinen im Laufe der Adsorption tragen auch zur Pellikelbildung an hydrophoben Oberflächen bei, da sich die hydrophilen Elemente der Proteine im Milieu der Mundhöhle an der Oberfläche und die hydrophoben Anteile im Inneren der Moleküle befinden. Während der Adsorption kann sich diese Konformation beim Übergang von der gelösten in die adsorbierte Form ändern (Pruitt et al. 1969, Norde 1984). Die Oberflächenladung und die freie Oberflächenenergie des adsorbierenden Werkstoffes bestimmen dabei das Ausmaß dieser Konformationsänderungen (Lundström 1985). Daher besitzen Proteine eine ausgeprägte Neigung zur Adsorption an hydrophoben polymeren Werkstoffen wie z.B. Teflon (Mac Ritchie 1978, Wilkes und Leach 1980, Lundström 1985, Absalom et al. 1987). Norde (1984) erklärt diese Adsorptionstendenzen an hydrophoben Oberflächen mit dem Entropiewechsel, der sich aus der Dehydratation der hydrophoben Oberfläche infolge der Proteinadsorption ergibt.

Teflon besitzt eine geringe freie Oberflächenenergie und damit auch eine geringe Benetzbarkeit seiner ausgeprägt hydrophoben Oberfläche (Maetani et al. 1984), dennoch werden Proteinnetzwerke auf seiner Oberfläche gefunden (Eberhardt et al. 1980). In der hier vorliegenden Studie konnten nach 3-minütiger Tragezeit deutlich mehr Banden auf Teflonprüfkörpern als auf Schmelzproben gefunden werden.

Biopolymere werden solange an einer Festkörperoberfläche adsorbiert, bis diese vollständig bedeckt ist. Die Dicke dieser Schicht beträgt dann zwischen 5 und 50 nm (Horbett 1982, Norde 1984, Absolom et al. 1987).

Die Spezifität der Proteine, die an einer Festkörperoberfläche adsorbiert werden, bleibt nur bis zur vollständigen Absättigung aller Bindungsstellen erhalten. Die initial adsorbierte Proteinschicht maskiert die oberflächenspezifischen Determinanten der Adsorption derart, dass eine bzw. wenige Proteinschichten ausreichen, um die Oberfläche effektiv vor weiteren Wechselwirkungen zu isolieren. Nur die Initialadsorption beruht auf der Interaktion zwischen Proteinmolekülen und der Festkörperoberfläche. Die weitere Proteinadsorption wird dann durch intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den präadsorbierten Biopolymeren und den Speichelproteinen determiniert (Söderqvist und Walton 1980, Embery et al. 1984, Norde 1984, Lamkin et al. 1996).

In mehreren einige Tage dauernden *In-vivo*-Studien konnte übereinstimmend festgestellt werden, dass es praktisch keine Unterschiede in der bakteriellen Besiedlung auf Materialien wie Gold, Silber, Amalgam, Titan, Keramik und Kunststoff gab (Blank et al. 1973, Hyypä und Paunio 1977, Nakzato et al. 1989, Krekeler et al. 1984, 1990, Leonhardt et al. 1995). Krämer et al. (1990) fanden eine gleichartige Plaqueanlagerung auch verschiedenen Verblendmaterialien innerhalb von 24 Stunden. Der geringe materialspezifische Einfluss auf die Plaqueanlagerung bestätigte sich auch bei der Untersuchung der bakteriellen Besiedlung. Pratt-Terpstra et al. (1989) stellten *in vitro* auf pellicelbedeckten Prüfkörpern aus Glas, Schmelz, Teflon und Zelluloseacetat eine gleichartige Adhärenz von verschiedenen Streptokokken fest. Auch Sandig et al. (1991) berichten von materialunabhängiger *in vitro* Biofilmbildung auf Dentalwerkstoffen.

Demgegenüber stehen die Ergebnisse von *In-vivo*-Studien, die von signifikanten Unterschieden hinsichtlich der Plaquemenge und deren Zusammensetzung in Abhängigkeit von der Festkörperoberfläche berichten (Van Dijk et al. 1987a, Krämer et al. 1989, Simonis et al. 1989, 1990, Weerkamp et al. 1989, Hahn et al. 1992, 1993). Grimm et al. (1989) und Siegrist et al. (1991) stellten werkstoffspezifische Unterschiede bezüglich der adhärierenden Keimzahl, nicht jedoch der qualitativen Zusammensetzung der Plaque auf Metallen, Kunststoffen und Keramik fest, wobei

sowohl Siegrist (1991), als auch Hannig M (1994) die auf den Werkstoffen adhärierende Plaquemenge eher mit der Oberflächenrauheit in Bezug brachten.

In zahlreichen klinischen Studien zeichneten sich die **Dentalkeramiken**, und insbesondere die Glaskeramiken, durch ihre geringe bakterielle Besiedlung aus (Wise und Dykema 1979, Chan und Weber 1986, Savitt et al. 1987, Simonis et al. 1989, Adamczyk und Spiechowicz 1990, Kodis et al. 1991). Sie akkumulieren laut Chan und Weber (1986), Savitt et al. (1987), Jensen et al. (1989), Hahn et al. (1992, 1993) weniger Plaque als die natürliche Zahnhartsubstanz. Dies steht im Gegensatz zu den jetzt vorliegenden Beobachtungen, bei denen auf Keramikprüfkörpern tendenziell mehr Banden als auf Schmelzprüfkörpern gefunden werden konnten. Hannig M (1998) konnte feststellen, dass unter dem Einfluss abscherender Zungenbewegungen auf allen palatinal getragenen Prüfkörpern unabhängig vom Material ein identisches Adsorptions- und Adhärenzverhalten zu beobachten war. Ebenso konnte Hannig M (1998) die Aussage von Ridge (1982) widerlegen, wonach auf Glasoberflächen kein Plaqueswachstum zu beobachten wäre, die initiale Plaquebildung auf Glas verlief genauso wie auf allen anderen Werkstoffen, was auch in dieser aktuellen Studie eindeutig zu belegen war.

Die Freisetzung von Metallionen aus **Amalgam** oder **Gusslegierungen** soll einen hemmenden Einfluss auf das Wachstum von Mikroorganismen haben und damit die Plaqueakkumulation verringern. Amalgame und Dentallegierungen besitzen somit antibakterielle Eigenschaften (Turkheim 1953, Updegraff et al. 1971, Glassman und Miller 1984, Sandig et al. 1984, Ørstavik 1985, Brauner 1988, Augthun und Brauner 1988). Dummer und Harrison (1982) fanden heraus, dass sich im Vergleich zu Gold oder Komposit auf Amalgam *in vitro* signifikant weniger Plaque anlagert. Hannig M (1998) konnte diesen antiadhärenten Effekt *in vivo* nicht nachweisen, ebenso wie in dieser Studie fanden auch Leonhardt et al. (1995) beim Vergleich der initialen Plaquebildung auf Amalgam, Titan und Schmelz *in vivo* weder quantitative noch qualitative Unterschiede, da die Pellikel in ihrer Funktion als Diffusionsbarriere eventuell den antibakteriellen Ionenfluss hemmen könnte. Der antibakterielle Effekt der Amalgame nimmt mit zunehmender Lagerung innerhalb weniger Tage deutlich ab (Nunez et al. 1976).

Aufgrund der Fluoridfreisetzung (Swift 1989 b, Hörsted-Bindslev und Larsen 1990, Behnen et al. 1990) und des initial niedrigen pH-Wertes (De Schepper et al. 1989) haben **Glasionomerzemente** einen das Wachstum von Mikroorganismen hemmenden Effekt (Tobias et al. 1985, De Schepper et al. 1989, Scherer et al. 1989, Behnen et al. 1989, Forss et al. 1991 a, b). Hannig M (1998) konnte auch hier raster- und transmissionselektronenoptisch keine ausgeprägten Unterschiede im Vergleich zu anderen Werkstoffen finden. Da die Prüfkörper vor der intraoralen Exposition erst über einen Zeitraum von 7 Tagen bei 100% Luftfeuchtigkeit gelagert wurden, nehmen die antimikrobiellen Eigenschaften deutlich ab. Aktuell konnten nur auf palatinal getragenen Glasionomerzement-Prüfkörpern weniger Banden als auf Schmelz gefunden werden.

In klinischen Studien (Larato 1972, Skjørlund 1973, Weitman und Eames 1975, Skjørlund und Sønju 1982, Svanberg et al. 1990) wurde festgestellt, dass es auf **Kompositen** und **Kunststoffen** signifikant höhere mikrobielle Besiedlung gibt. Hannig M (1998) konnte dagegen keinen Unterschied zwischen Komposit, Kunststoff und anderen Materialien feststellen. Auch in den aktuellen Versuchen zeigte sich, dass auf Komposit-, Kunststoff- und Teflonproben praktisch gleich viele Banden zu finden waren.

Maetani et al. (1984) untersuchten unter *In-vitro*-Bedingungen die Plaquebildung auf **teflon**beschichteten und unbeschichteten Metallen. Dabei war zu beobachten, dass die beschichteten Metalloberflächen initial signifikant geringer besiedelt waren als die unbeschichteten, nach 3 Tagen war aber zwischen beiden kein Unterschied mehr zu verzeichnen.

### **5.2.2 Einfluss der Materialoberflächen auf die Pellikelbildung und die bakterielle Adhärenz**

Grundsätzlich bildet sich auf allen in die Mundhöhle eingebrachten Materialoberflächen innerhalb von Sekunden ein organischer Biofilm aus. Dieser konditioniert und determiniert die Festkörperoberfläche für die sich anschließende bakterielle Besiedlung. Somit stellt nicht die Festkörperoberfläche selbst, sondern die omnipräsente, auf allen Werkstoffen adsorbierte Proteinschicht das Medium für die Erstbesiedlung durch Mikroorganismen dar.

Da orale Mikroorganismen auf allen mit einer Pellikel bedeckten Oberflächen adhären können, muss die initiale bakterielle Adhärenz durch unspezifische physikalisch-chemische Interaktionen erfolgen (Leonhardt et al. 1995, Marsh und Bradshaw 1995).

Durch die Pellikelbildung wird die Benetzbarkeit von Substraten mit unterschiedlicher freier Oberflächenenergie auf ein vergleichbares Niveau gebracht (Jendresen und Glantz 1981, Glantz et al. 1982, Van Dijk et al. 1987 a, 1988, Morge et al. 1989). Die Unterschiede in der freien Oberflächenenergie der einzelnen Werkstoffe sind nach der Bedeckung durch die Pellikel nicht mehr nachweisbar (Jendresen und Glantz 1980).

Trotz der annähernd gleichen Oberflächenenergie nach der Pellikelbildung wird die anschließende bakterielle Adhärenz in gewissem Umfang noch durch die freie Oberflächenenergie der Materialien bestimmt (Absolom et al. 1983, Busscher et al. 1984c, Uyen et al. 1985, Pratt-Terpstra et al. 1987, Van Dijk et al. 1987a, Weerkamp et al. 1989).

Die Oberflächenrauheit spielt im Vergleich zur freien Oberflächenenergie im Bezug auf die Plaqueanlagerung die wichtigere Rolle (Quiryneen et al. 1990, Quiryneen und Bollen 1995).

Je besser die Oberflächenpolitur eines Werkstoffes, desto resistenter erweist er sich in Lokalisationen mit geringer Pellikelbildungsrate gegenüber der bakteriellen Adhärenz. In diesem Zusammenhang erweist sich die Eigenschaft der Pellikel, Oberflächenunregelmäßigkeiten zu nivellieren, als eine gewisse Schutzfunktion gegen die mikrobielle Besiedlung. Dies bestätigte sich auch in der vorliegenden Studie, wobei sich auf besonders gut zu polierenden Oberflächen wie Keramik und

Teflon tendenziell weniger Proteinmengen auf palatinal getragenen Prüfkörpern fanden.

Van der Waals'sche Kräfte reichen über 50 nm weit und sind für die initiale Annäherung und Adhäsion von Bakterien an Festkörperoberflächen verantwortlich (Busscher und Weerkamp 1987).

Die Ergebnisse der elektronenoptischen Studie von Hannig M (1998) scheinen dabei zu bestätigen, dass die Pellikelbildung die materialspezifischen Charakteristika maskiert und nivelliert, so dass auf allen Materialien weitestgehend gleiche Bedingungen für die nachfolgende bakterielle Adhärenz herrschen.

Die Nivellierung der Oberflächenunregelmäßigkeiten auf Prüfkörperoberflächen durch die Adsorption von Biopolymeren unterlagen in dieser Studie ausgeprägten lokalisationsabhängigen und in geringem Maße auch materialspezifischen Gesetzmäßigkeiten. Dabei wurden Irregularitäten auf Metallen, Keramik und Glasionomorzement in bukkalen Regionen bis zu mehreren Mikrometern mit organischem Material aufgefüllt, bei Polymerwerkstoffen und Schmelz war dies weniger ausgeprägt, bei palatinalen Kompositprüfkörpern waren Rillen bis zu einem Mikrometer schon nach 2 Stunden aufgefüllt.

Eine andere Überlegung weist dahin, dass die Pellikel aufgrund materialspezifischer selektiver Proteinadsorption die Eigenschaften der Festkörperoberfläche widerspiegelt, wie Fletscher und Loeb (1979) und Dexter et al. (1975, 1979) aus den Ergebnissen von *In-vitro*-Studien folgerten.

Sønju und Glantz 1975, Sønju und Skjørland 1976, Eberhardt et al. 1982, Brynda et al. 1984, Rudee und Price 1985, Hlady et al. 1986, Little und Zsolnay 1985 und Lundstrøm 1985 betrachteten als mögliche Ursache für den substratinduzierten Transfer von Oberflächeneigenschaften in die Pellikel die unterschiedliche molekulare Zusammensetzung der adsorbierten Proteinschichten, die adsorbierte Proteinmenge im Zeitverlauf und in der Art der Oberflächenbedeckung, sowohl als Netzwerk als auch als kontinuierliche Schicht, Eigenschaften die auch durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie belegt werden.

Absolom et al. (1987) schlugen vor, dass die Konformationsänderungen der Proteinmoleküle während der Adsorption durch die materialspezifischen charakteristischen Eigenschaften der jeweiligen Festkörperoberfläche bestimmt würden.

Die spezifischen chemischen Interaktionen zwischen den im flüssigen Medium gelösten Proteinen und der Festkörperoberfläche können nur solange wirken, bis die Oberfläche durch den präadsorbierten Biofilm bedeckt und damit isoliert ist (Lundström 1985, Absolom et al. 1987).

Die 10 bis 20 nm dicke Pellikelbasisschicht reicht dabei für die Abschirmung der Materialoberflächen aus. Werkstoffbestandteile, die tiefer als 10 nm im Inneren des Festkörpers liegen, haben keinen Einfluss mehr auf dessen Oberflächencharakteristika (Glantz 1977).

Das fast identische ultrastrukturelle Erscheinungsbild der Pellikel auf verschiedenen Werkstoffoberflächen schließt materialabhängige Unterschiede in der chemischen und biochemischen Zusammensetzung der Pellikel nicht aus (Sønju und Glantz 1975, Sønju und Skjørland 1976). Sie fanden geringfügige Differenzen in der Aminosäurezusammensetzung (unterschiedliche Prolingehalte) der *in vivo* gebildeten 2-Stunden-Pellikel auf verschiedenen Füllungsmaterialien und deuteten es als Hinweis auf eine mögliche materialabhängige Selektivität der Proteinadsorption.

Baker et al. (1984) fanden Unterschiede innerhalb einzelner Proteinkomponenten der adsorbierten Pellikel auf Glas, Rinderschmelz und Hydroxylapatit.

Öste et al. (1981) fanden keine signifikanten Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung der 2-Stunden-Pellikel auf Zahnschmelz und Plastikfilmen. In der nun vorliegenden Arbeit konnten tendenzielle, aber nicht statistisch signifikante inter- und intraindividuelle Unterschiede im Proteinbandenmuster auf den verschiedenen Materialien gefunden werden.

### 5.2.3 Bandenanzahl und -verteilung

Die 18 High-Tris-Gele zeigten im Gegensatz zu allen bisherigen Studienergebnissen unabhängig vom Substrat (Werkstoff) bis zu 65 Banden je Laufspur mit ermittelten Molekulargewichten zwischen 6,1 und 334,37 kDa. Diese hohen Bandenanzahlen befinden sich in guter Übereinstimmung mit aktuell publizierten Ergebnissen von massenspektrometrischen Analysen der *In-vivo*-Pellikel (von Schmelzproben), bei denen bis zu 130 verschiedene Proteine, Peptide bzw. Proteinbruchstücke in der auf Zahnschmelz *in situ* gebildeten Pellikel identifiziert werden konnten (Jao et al. 2003, Siqueira et. Al 2007, Vitorino et al. 2007, 2008). Die absoluten Zahlen sind dabei mit Vorsicht zu betrachten, da die Werte anhand des Vergleichs mit der Markerspur

errechnet wurden, und alle Werte oberhalb von 220 und unterhalb von 10 kDa wegen der exponentiellen Stauchung und der Lage außerhalb des Markerbereiches einer größeren Fehlertoleranz unterlagen. Auch die absolute Bandenanzahl ist, wie bereits erwähnt, durch die Einstellungsparameter der Detektionssensitivität der Analysesoftware determiniert, je sensibler die Einstellung, desto mehr „Pseudobanden“ werden erkannt. Weiterhin ist die 1,5-fach größere Oberfläche der Titanprüfkörper und die trotz Politur unterschiedliche Oberflächenrauheit der Prüfkörper zu berücksichtigen.

Bei den bukkal getragenen Prüfkörpern war mit Ausnahme von Gold und Amalgam, bei allen Werkstoffen eine Zunahme der Bandenanzahl im Verlauf der längeren Expositionszeiten von 3 auf 120 Minuten um 3 bis 10 Banden zu verzeichnen. Bei Gold nahm die durchschnittliche Anzahl innerhalb der Expositionszeit von 3 nach 30 Minuten um 3 Banden ab, bei Amalgam verringerte sich die Zahl um 2 Banden von 30 nach 120 Minuten Tragezeit.

Auf den palatinalen Proben zeigte sich bei allen Werkstoffen außer Gold, Teflon und GIZ eine Zunahme der Bandenanzahl um 3 bis 6 Banden von 3 nach 120 Minuten. Im Verlauf von 3 nach 30 Minuten verringerte sich die Bandenzahl bei den zuvor genannten Werkstoffen um 1 bis 2 Banden.

Nach einer Tragezeit von 30 und 120 Minuten zeigten sich palatinal durchschnittlich 3 bis 5 Banden weniger als bukkal. Initial waren auf palatinal getragenen Keramikprüfkörpern 3 Banden weniger als auf bukkal getragenen.

Nach 3 Minuten zeigten palatinale Keramik - und GIZ - Proben 3 bis 4 Banden weniger als die bukkalen. Gold, Schmelz und Glas hatten palatinal initial bis zu 2 Banden mehr als bukkal. Schmelz, Titan, Glas und Komposit wiesen nach 3 Minuten sowohl bukkal als auch palatinal bis zu 4 Banden weniger auf als die übrigen Werkstoffe.

Allerdings erwiesen sich diese Unterschiede bei der statistischen Analyse als nicht signifikant.

Nach 30 Minuten zeigte sich ein weitestgehend nivelliertes Bandenverhältnis aller Werkstoffe und Lokalisationen. Insgesamt hatten die palatinalen Proben bis zu 7 Banden weniger als die bukkalen, mit Ausnahme von Gold und Keramik, die 1 bis 3 Banden mehr hatten.

Glas hatte bukkal die meisten Banden, Teflon und GIZ palatinal die wenigsten.

Nach 120 Minuten gab es wieder deutliche Abweichungen. Mit Ausnahme von Gold und Amalgam hatten alle Werkstoffe bukkal 3 bis 5 Banden mehr als palatinal. Titan hatte mit 49 die meisten bukkalen Banden, Gold mit 42 die wenigsten, Schmelz zeigte sich sowohl bukkal als auch palatinal mit 46 Banden als sehr konstant.

Die Abweichungen innerhalb der Werkstoffe konnten nicht als statistisch signifikant gewertet werden. Um genauere Aussagen treffen zu können, ist auch die Anzahl der Probanden in der vorliegenden Studie zu gering und müsste dazu mindestens auf 20 erhöht werden.

Die Ergebnisse anderer Studien zur Proteinzusammensetzung der Schmelzpellikel (Stigler et al. 2003, Hannig M et al. 2005, Carlén et al. 1998) sagten aus, dass mittels der SDS-Methode allein die Proteine der Pellikelbasisschicht nur sehr spärlich bis gar nicht zu desorbieren wären, was im geringen Vorkommen der niedermolekularen Proteine zu erkennen wäre. Dies konnte in der vorliegenden Studie jedoch nicht bestätigt werden. Hier waren auch die niedermolekularen Proteine als voluminöse Banden in großer Zahl vertreten.

Auch die Proteine mit Molekulargewichten zwischen 73 und 190 kDa konnten bei Stigler et al. (2003) fast ausschließlich mit der EDTA-Methode nachgewiesen werden. Auch dies konnte mit der aktuellen Studie nicht bestätigt werden.

Die Pellikelbasisschicht auf Schmelz besteht vor allem aus den zum Hydroxylapatit hoch affinen (Kousvelari et al. 1980, Bennick et al. 1983, Moreno et al. 1984, Embery et al. 1986, Johnson et al. 1991) adsorbierten niedermolekularen Phosphoproteinen Histatin, Statherin, Cystatin und PRP`s (Lamkin et al. 1996). Schüpbach et al. (2001) konnten vor allem Statherin (8 kDa) in der Basisschicht nachweisen. Die niedermolekularen Proteine mit Molekulargewichten zwischen 8 und 11 kDa scheinen hauptsächlich an der Bildung der initial adsorbierten Pellikelschicht beteiligt zu sein.

Stigler et al. (2003) konnten sowohl mit der SDS-Methode, als auch mittels EDTA nur bis zu 11 Proteinbanden zwischen 5 und 73 kDa aus auf Schmelzproben *in situ* gebildeten Pellikeln gelelektrophoretisch nachweisen. Sie konnten keine lokalisationsabhängigen Unterschiede finden.

Mit Ausnahme von MG1 (>1000 kDa), Fibronektin (2225 kDa) und eventuell Agglutinin (300 – 400 kDa) und Histatin (3 – 5 kDa) sind wahrscheinlich alle der in

der Einleitungstabelle (Seite 39 f) genannten 21 bisher identifizierten Proteine in den detektierten Banden der vorliegenden Studie vertreten. Es ist anzunehmen, dass sich viele weitere, bisher nicht identifizierte Proteine hinter den zahlreichen Banden verbergen.

### 5.2.4 Molekulargewichte

Die Mittelwerte der errechneten Molekulargewichte lagen zwischen 6,1 und 334,37 kDa. Die durchschnittliche Verteilung der Molekulargewichte innerhalb der Zeiten, Lokalisationen, Werkstoffe und Probanden zeigte ein recht einheitliches Verteilungsbild (ohne signifikante Unterschiede).

Nach 3 Minuten wiesen die niedrigsten, auf den Substraten Teflon und Kunststoff und bedingt auch Komposit gegenüber den anderen Werkstoffen ermittelten, Molekulargewichte sowohl bukkal, wie auch palatinal, höhere Molekulargewichte auf. Während die übrigen Werkstoffe bereits Banden zwischen 6 und 8 kDa zeigten, fanden sich auf den polymeren Werkstoffen erst Banden zwischen 9 und 12 kDa, bei Teflon, Schmelz und Glas fehlten oft die Banden zwischen 0 und 15 kDa.

Palatinal waren die ermittelten niedrigen Molekulargewichte 1 bis 2 kDa größer als bukkal, und die größten Werte zwischen 5 und 20 kDa niedriger.

Nach 30 min waren fast alle Ausgangsmolekulargewichte um 1 bis 2 kDa höher und die Höchstwerte deutlich um bis zu 20 kDa niedriger als nach 3 min. Teflon zeigte weiterhin den höchsten Ausgangswert zwischen 10 und 11 kDa, bei Gold lag er nun auch bei 9 bis 10 kDa.

Nach 120 min lagen fast alle Ausgangswerte zwischen 7 und 8 kDa, Amalgam bei 9 kDa, die hohen Werte über 300 kDa wie nach 3 min wurden nach 30 und 120 min mit einer Ausnahme (Teflon 302 kDa) nicht mehr erreicht, sie lagen nur noch zwischen 288 und 299 kDa.

Bei den Speichelproben lagen die meisten niedermolekularen Banden bei 10 kDa, selten bei 9 und 12 kDa. Die höchsten Durchschnittswerte lagen um die 280 kDa.

Die Ergebnisse unterstreichen die zeit- und lokalisationsabhängigen Maturationsprozesse der Pellikel unter dem Einfluss von Ad- und Desorption.

Den polymeren Werkstoffen fehlten nach 3 min meist die niedermolekularen Proteinbanden unter 10 kDa, nach 30 min wurden die hochmolekularen Banden über 300 kDa nur noch selten gefunden, nach 120 min wiesen alle Werkstoffe zusätzlich Banden niedrigerer Molekulargewichte auf, ein nachweisbarer Unterschied hinsichtlich der Molekulargewichte zwischen bukkal und palatinal bestand nach 120 min nicht mehr.

Eggen und Rølla (1982, 1983) fanden damals bereits heraus, dass der Hauptanteil der in der Pellikel zu findenden Proteine Molekulargewichte unter 67 kDa aufweist.

Dies deckt sich auch mit der vorliegenden Studie, wobei hier die Grenze eher bei 80 kDa anzusetzen ist. Zwischen 80 und 25 kDa zeigte sich bei praktisch allen Spuren regelmäßig die gleiche konstante Bandenverteilung, die meisten Banden besaßen Molekulargewichte unter 80 kDa.

Yao et al. (2001) konnten bei *in vitro* gebildeten Pellikeln Molekulargewichte zwischen 6 und 89 kDa finden. Al-Hashimi und Levine (1989) und Carlén et al. (1998) entdeckten hochmolekulare Muzine mit Molekulargewichten zwischen 100 und 250 kDa bei der Analyse von *In-vivo*-Pellikeln auf Zahnschmelz.

Auch diese Banden waren regelmäßig in der aktuellen Studie vertreten.

### 5.2.5 Schlussfolgerung und Ausblick

- Auf allen in die Mundhöhle eingebrachten Festkörperoberflächen bildete sich innerhalb kürzester Zeit ein Biofilm aus.
- Bis zu 65 Einzelbanden mit Molekulargewichten zwischen 6,1 und 334,37 kDa konnten regelmäßig gefunden werden.
- Nach 3-minütiger intraoraler Expositionszeit war fast das gesamte Spektrum aller im Speichel enthaltener Proteine auf den Oberflächen zu finden, was die bisherige Annahme der selektiven Adsorption als Basis der Pellikelbildung in Frage stellt.
- Innerhalb der 3 Reinigungsstufen der Vollspeichelproben und innerhalb der einzelnen Probanden auch im Vergleich zu den Werkstoffproben gab es keine signifikanten Unterschiede.
- Mit zunehmender Expositionszeit war ein Reifeprozess zu beobachten, die Bandenanzahl änderte sich nur unwesentlich.

- Zeitabhängige Veränderungen innerhalb der Bandenverteilung zeigten sich vor allem oberhalb von 90 kDa und unterhalb von 15 kDa.
- Auf palatinalen Prüfkörperoberflächen war anhand des optischen Eindrucks auf die Adsorption einer geringeren Proteinmenge zu schließen, das Bandenmuster war praktisch gleich.
- Die Werkstoffoberfläche bzw. die materialspezifischen Charakteristika hatten keinen wesentlichen Einfluss auf die Proteinadhäsion. Es waren keine signifikanten Unterschiede, sondern nur Tendenzen feststellbar.
- Selbst innerhalb eines Probanden war das Adsorptionsmuster auf den jeweiligen Werkstoffen nicht stets gleich.
- Eine exakte Analyse aller einzelnen Banden war technisch nicht möglich.
- In einer 2D-Elektrophorese und mittels Änderung der Gelgradienten sind noch mehr Banden ermittelbar.
- Eine exakte Bestimmung und Identifizierung aller einzelnen Banden und die Feststellung, ob spezielle Banden bei einzelnen Werkstoffen fehlen, könnte evtl. noch interessante Aspekte liefern.
- Die vorliegenden Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die in der Mundhöhle verwendeten Werkstoffe keinen erkennbaren Einfluss auf eine unterschiedliche Proteinadsorption auf den einzelnen Substraten bewirken. Grundsätzlich ist davon auszugehen, dass durch die Entwicklung neuer Materialien im nanostrukturellen Bereich eine Verminderung der Plaqueakkumulation in der Mundhöhle erreicht werden kann. Dabei darf nicht vergessen werden, dass durch die Verbesserung der individuellen Mundhygiene und aufgrund des veränderten Prophylaxebewusstseins die Kariesinzidenz heute auf ihrem niedrigsten Stand seit Beginn der Beobachtung angelangt ist. Die optimale Mundhygiene ist durch nichts zu ersetzen und stellt die beste Prävention dar.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Absolom DR, Lamberti FV, Policova Z, Zingg W, Van Oss CJ, Neumann AW (1983) Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Appl Environ Microbiol* 46:90-97
2. Absolom DR, Zingg W, Neumann AW (1987) Protein adsorption to polymer particles: Role of surface properties. *J Biomed Mater Res* 21:161-171
3. Adamczyk E, Spiechowicz E (1990) Plaque accumulation on crowns made of various materials. *Int J Prosthodont* 3:285-291
4. Adams D, Stipho HDK, Murphy WM (1979) Variations in the initial formation of pellicle and plaque on enamel in vivo. *J Dent* 7:169-173
5. Afseth F, Rølla G (1983) Clinical experiments with a toothpaste containing amyloglucosidase and glucose oxidase. *Caries Res* 17:472-475
6. Aguirre A, Mendoza B, Levine MJ, Hatton MN, Douglas WH (1989) In vitro characterisation of human salivary lubrication. *Arch Oral Biol* 34:675-677
7. Al-Hashimi I, Levine MJ (1989) Characterisation of in vivo salivary-derived enamel pellicle. *Arch Oral Biol* 34:289-295
8. Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM, Milosevic A (1999) Thickness of acquired salivary pellicle as a determinant of the sites of dental erosion. *J Dent Res* 78:1821-1828
9. Aoba T, Moreno EC, Hay DI (1984) Initiation of apatite crystal growth by the amino-terminal segment of human salivary acidic proline-rich proteins. *Calcif Tiss Int* 36:651-658

10. Applebaum B, Golb E, Holt SC, Rosan B (1979) In vitro studies of dental plaque formation: Adsorption of oral streptococci to hydroxyapatite. *Infect Immun* 25:717-728
11. Arends J, Schuthof J, Christoffersen J (1986) Inhibition of enamel demineralization by albumin in vitro. *Caries Res* 20:337-340
12. Armstrong WG (1966) Amino-acid composition of the acquired pellicle of human tooth enamel. *Nature* 210:197-198
13. Armstrong WG (1967) The composition of organic films formed on human teeth. *Caries Res* 1:89-103
14. Armstrong WG (1968) Origin and nature of the acquired pellicle. *Proc Royal Soc Med* 61:923-930
15. Armstrong WG (1971) Characterisation studies on the specific human salivary proteins adsorbed in vitro by hydroxyapatite. *Caries Res* 5:215-227
16. Armstrong WG, Hayward AF (1968) Acquired organic integuments of human enamel. A comparison of analytical studies with optical, phasecontrast and electron microscope examinations. *Caries Res* 2:294-305
17. Arnebrant T, Simonsson T (1991) The effect of ionic surfactants on salivary proteins adsorbed on silica surfaces. *Acta Odontol Scand* 49:281-288
18. Arnold RR, Brewer M, Gauthier JJ (1980) Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. *Infect Immun* 28:893-898
19. Attin T, Hannig C (2002) Aloe vera als Therapeutikum gegen Gingivitis. *Prophylaxe Dialog* 15:3

20. Augthun M, Brauner A (1988) Antibakterielle Wirkung unterschiedlicher Dentallegierungen auf Keime der oralen Mundflora in vitro. Dtsch Zahnärztl Z 43:869-873
21. Baier RE (1977) On the formation of biological films. Swed Dent J 1:261-271
22. Baier RE, Meyer AE, Natiella JR, Natiella RR, Carter JM (1984) Surface properties determine bioadhesive outcomes: Methods and results. J Biomed Mater Res 18:337-335
23. Behnen MJ, Sectors JC, Palenik CJ, Miller CH (1990) Antimicrobial abilities of various glass ionomers. J Dent Res 69:312, Abstr. No. 1625
24. Bennick A (1977) The binding of calcium to a salivary phosphoprotein, protein C, and comparison with calcium binding to protein A, a related salivary phosphoprotein. Biochem J 163:241-245
25. Bennick A, Cannon M, Madapallimattan G (1979) The nature of the hydroxyapatite-binding site in salivary acidic proline-rich proteins. Biochem J 183:115-126
26. Bennick A, Cannon M, Madapallimattan G (1981a) Factors affecting the adsorption of salivary acidic proline rich proteins to hydroxyapatite. Caries Res 15:9-20
27. Bennick A, Chan G, Goodlin R, Abrams S, Tustian D, Madapallimattam G (1983) The role of human salivary acidic proline-rich Proteins in the formation of acquired dental pellicle in vivo and their fate after adsorption to the human enamel surface. Arch Oral Biol 28:19-27
28. Bennick A, Mc Laughlin AC, Gray AA, Madapallimattam G (1981b) The location and nature of calcium binding sites in salivary acidic prolin-rich phosphoproteins. J Biol Chem 256:4741-4746

29. Berg IC, Rutland MW, Arnebrant T (2003) Lubricating properties of the salivary pellicle an AFM study. *Biofouling* 19:365-369
30. Berthold CH, Berthold P, Söder PO (1971) The growth of dental plaque on different materials. *Sven Tandläk Tidskr* 64:863-877
31. Berthold P (1979) Formation of salivary coating and dental plaque on two different supporting materials. *J Periodontol* 50:397-405
32. Bjørck L, Rosen C, Marshall V, Reiter B (1975) Antibacterial activity of the lactoperoxidasesystem in milk against pseudomonads and other gram-negative bacteria. *Appl Microbiol* 30:199-204
33. Blank LW, Cafesse RG, Charbeneau GT (1973) The gingival response to well-finished composite resin restorations. *J Prosthet Dent* 42:626-632
34. Bobek LA, Levine MJ (1982) Cystatins-inhibitors of cysteine proteinases. *Crit Rev Oral Biol Med* 3:307-332
35. Boehm HP (1974) Funktionelle Gruppen an Festkörperoberflächen. *Chem Ing Techn* 46:716-719
36. Brandtzaeg P (1971) Human secretory immunoglobulins. VII. Concentrations of parotid IgA and other secretory proteins in relation to the rate of flow and duration of secretory stimulus. *Arch Oral Biol* 16:1295-1310
37. Brandtzaeg P, Fjellanger I, Geruldsen ST (1970). Human secretory immunoglobulins. I. Salivary secretions from individuals with normal or low levels of serum immunoglobulins. *Scand J Haematol Suppl* 12:3-83
38. Brauner A (1988) Die bakterielle Besiedlung von zahnärztlichen Werkstoffen: Amalgame. *Zahnärztl Prax* 39:167-170

39. Brynda E, Cepalova NA, Stol M (1984) Equilibrium adsorption of human serum albumin and human fibrinogen on hydrophobic and hydrophilic surfaces. *J Biomed Mater Res* 18:685-693
40. Buddecke E (1981) *Biochemische Grundlagen der Zahnmedizin*. De Gruyter, Berlin, New York
41. Busscher HJ, Uyen HM, Stokroos I, Jongebloed WL (1989) A transmission electron microscopy study of the absorption patterns of early developing artificial pellicles on human enamel. *Arch Oral Biol* 34:803-810
42. Busscher HJ, Weerkamp AH (1987) Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. *FEMS Microbiol Rev* 46:165-173
43. Busscher HJ, Weerkamp AJ, Van der Mei HC, Van Pelt AWJ, De Jong HP, Arends J (1984c) Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl Environ Microbiol* 48:980-983
44. Busscher HJ, White DJ, Kamminga-Rasker HJ, Poortinga AT, van der Mei HC (2003) Influence of oral detergents and chlorhexidine on soft-layer electrokinetic parameters of the acquired enamel pellicle. *Caries Res* 37:431-436
45. Carlén A, Borjesson AC, Nikdel L, Olsson J (1998) Composition of pellicles formed in vivo on tooth surfaces in different parts of the dentition, and in vitro on hydroxyapatite. *Caries Res* 32:447-455
46. Carlén A, Nikdel K, Wennerberg A, Holmberg K, Olsson J (2001) Surface characteristics and in vitro biofilm formation on glass ionomer and composite resin. *Biomaterials* 22:481-487

47. Carlén A, Olsson J (1995) Monoclonal antibodies against a high-molecular-weight agglutinin block adherence to experimental pellicles on hydroxyapatite and aggregation of streptococcus mutans. *J Dent Res* 74:1040-1047
48. Carlén A, Olsson J, Borjesson AC (1996) Saliva-mediated binding in vitro and prevalence in vivo of streptococcus mutans. *Arch Oral Biol* 41:35-39
49. Carlén A, Rüdiger SG, Loggner I, Olsson J (2003) Bacteriabinbinding plasma proteins in pellicles formed on hydroxyapatite in vitro and on teeth in vivo. *Oral Microbiol Immunol* 18:203-207
50. Cassels FJ, Hughes CV, Nauss JL (1995) Adhesin receptors of human oral bacteria and modelling of putative adhesin binding domains. *J Indust Micro* 15:176-185
51. Chan CR, Weber H (1986) Plaque retention on teeth restored with fullceramic crowns: a comparative study. *J Prosthet Dent* 56:666-671
52. Chase SW (1926) The origin, structure, and duration of Nasmyth's membrane. *Anat Rec* 33:357-376
53. Chia JS, Hsieh CC, Yang CS, Chen JY (1995) Purification and characterization of streptococcus mutans glycosyltransferase (GtfC) expressed in escherichia coli. *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue ZA Zhi* 28:242-255
54. Christersson CE (1991) On salivary film formation and bacterial retention to solids. A methodological and experimental in vitro study. *Swed Dent J* 77 (Suppl) 1-82

55. Clark WB, Gibbons RJ (1977) Influence of salivary components and extracellular polysaccharide synthesis from sucrose on the attachment of streptococcus mutans 6715 to hydroxyapatite surfaces. *Infect Immun* 18:514-523
56. Cohen B, Colman G, Russel RR (1979) Immunisation against dental caries: further studies. *Br Dent J* 147:9-14
57. Davidson CL, Boom G, Arends J (1973) Calcium distribution in human and bovine surface enamel. *Caries Res* 7:349-359
58. Dawes C, Jenkins GN, Tonge CH (1963) The nomenclature of the integuments of the enamel surface of teeth. *Br Dent J* 115:65-68
59. De Jong HP, De Boer P, Busscher HJ, Van Pelt AWJ, Arends J (1984) Surface free energy changes of human enamel during pellicle formation: An in vivo study. *Caries Res* 18:408-415
60. De Jong HP, De Boer P, Busscher HJ, Van Pelt AWJ, Arends J (1984b) Surface free energy of human enamel after pellicle formation and fluoride application. In: Ten Cate JM, Leach SA, Arends J *Bacterial adhesion and preventive dentistry* 1.Aufl., IRL Press, Oxford 125-131
61. De Schepper EJ, White RR, Van der Lehr W (1989) Antibacterial effects of glass ionomers. *Am J Dent* 2:51-56
62. Deimling D, Breschi L, Hoth-Hannig W, Ruggeri A, Hannig C, Nekrashevych Y, Prati C, Hannig M (2004) Electron microscopic detection of salivary alpha-amylase in the pellicle formed in situ. *Eur J Oral Sci* 112:503-509
63. Deimling D, Hannig C, Hoth-Hannig W, Schmitz P, Schulte-Mönting J, Hannig M (2007) Non-destructive visualisation of protective proteins in the in situ pellicle. *Clin Oral Invest* 11:211-216

64. Dexter SC (1979) Influence of substratum critical surface tension on bacterial adhesion – in situ studies. *J Colloid Interface Sci* 70:346-354
65. Dexter SC, Sullivan JD, Williams SJ, Watson SW (1975) Influence of substratum wettability on the attachment of marine bacteria to various substrata. *Appl Microbiol* 30:298-308
66. Douglas CWI (1983) The binding of human salivary  $\alpha$ -amylase by oral starins of streptococcal bacteria. *Arch Oral Biol* 28:567-573
67. Douglas CWI (1990) Characterisation of the alpha-amylase receptor of *Streptococcus gordonii* NCTC 7868. *J Dent Res* 69:1746-1752
68. Douglas WH, Reeh ES, Ramasubbu N, Raj PA, Bhandary KK, Levine MJ (1991) Statherin: a major boundary lubricant of human saliva. *Biochem Biophys Res Commun* 180:91-97
69. Dummer PMH, Harrison KA (1982) In vitro plaque formation on commonly used dental materials. *J Oral Rehabil* 9:413-417
70. Eberhart RC, Lynch ME, Bilge FH, Wissinger JF, Munro MS, Ellsworth SR, Qualtrone AJ (1982) Protein adsorption on polymers. *Adv Chem Ser* 199:293-315
71. Edgerton M, Koshlukova SE (2000) Salivary histatin 5 and its similarities to the other antimicrobial proteins in human saliva. *Adv Dent Res* 14:16-21
72. Edgerton M, Levine MJ (1992) Characterisation of acquired denture pellicle from healthy and stomatitis patients. *J Prosthet Dent* 68:683-691
73. Edgerton M, Scannapieco FA, Reddy MS, Levine MJ (1993) Human submandibular-sublingual saliva promotes adhesion of *Candida albicans* to polymethylmethacrylate. *Infect Immun* 61:2644-2652

74. Ellen RP (1985) Specificity of attachment as a tissue-tropic influence of oral bacteria. In: Mergenhagen SE, Rosan B Molecular basis of oral microbiol adhesion. 1. Aufl. American Society of Microbiology, Washington DC, 33-39
75. Ellingsen JE, Rølla G (1994) Dental plaque inhibition by a combination of triclosan and polydimethylsiloxane (silicone oil). Scand J Dent Res 102:26-29
76. Eggen KH, Rølla G (1982) Gel filtration, ion exchange chromatography and chemical analysis of macromolecules present in acquired enamel pellicle (2-hour-pellicle). Scand J Dent Res 90:182-188
77. Eggen KH, Rølla G (1983) Further studies on the composition of the acquired enamel pellicle. Scand J Dent Res 91:439-446
78. Embery G, Heaney TG, Stanbury JB (1986) Studies on the organic polyanionic constituents of human acquired dental pellicle. Arch Oral Biol 31:623-625
79. Embery G, Hogg SD, Heaney TG, Stanbury JB, Green DRJ (1984) Some considerations on dental pellicle formation and early bacterial colonisation: the role of high and low molecular weight proteins of the major and minor salivary glands. In: ten Cate JM, Leach SA, Arends J Bacterial adhesion and preventive dentistry. 1. Aufl., IRL Press, Oxford 73-84
80. Engel T (1986) Low-energy atom scattering from surfaces. Science 56:491-495
81. Ericson T, Pruitt KM, Arwin H, Lundström I (1982) Ellipsometric studies of film formation on tooth enamel and hydrophilic silicon surfaces. Acta Odontol Scand 40:197-201

82. Ericson T, Rundegren J (1983) Characterization of a salivary agglutinin reacting with a serotype c strain of streptococcus mutans. Eur J Biochem 133:255-261
83. Ericsson Y (1959) Clinical investigation of the salivary buffering action. Acta Odontol Scand 17:131-165
84. Esser M, Tinschert J, Marx R (1998) Materialkennwerte der Zahnhartsubstanz des Rindes im Vergleich zur humanen Zahnhartsubstanz. Dtsch Zahnärztl Z 53:713-717
85. Etemadzadeh H, Ainamo J, Murtomaa H (1985) Plaque growth-inhibiting effects of an abrasive fluoride-chlorhexidine toothpaste and a fluoride toothpaste containing oxidative enzymes. J Clin Periodontol 12:607-616
86. Everhart DL, Mallet CP, Doyle G (1985) Dental caries vaccine: some problems solved? Microbiol Sci 2:312-313
87. Featherstone JDB, Behrman JM, Bell JE (1993) Effect of whole saliva components on enamel demineralization in vitro. Crit Rev Oral Biol Med 4:357-362
88. Ferretti JJ, Shea C, Humphrey MW (1980) Cross-reactivity of Streptococcus mutans antigens and human heart tissue. Infect Immun 30:69-73
89. Fine DH, Wilton JMA, Caravana C (1984) In vitro sorption of albumin, immunoglobulin G and lysozyme to enamel and cementum from human teeth. Infect Immun 44:332-338
90. Finke M, Parker DM, Jandt KD (2002) Influence of soft drinks on the thickness and morphology of in situ acquired pellicle layer on enamel. J Colloid Interface Sci 251:263-270

91. Fisher SJ, Prakobphol A, Kajisa L, Murray PA (1987) External radiolabelling of components of pellicle on human enamel and cementum. *Arch Oral Biol* 32:509-517
92. Fletcher M, Loeb GS (1979) Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. *Appl Environ Microbiol* 37:67-72
93. Forss H, Jokinen J, Spets-Haponen S, Seppä L, Luoma H (1991a) Fluoride and mutans streptococci in plaque grown on glass ionomer and composite. *Caries Res* 25:454-458
94. Forss H, Seppä L, Alakuijala P (1991b) Plaque accumulation on glass ionomer filling materials. *Proc Finn Dent Soc* 87:343-350
95. Frank R (1949) Recherches sur la membrane de Nasmyth. *Comptes Rendues des Séances de la Societé de Biologie* 143 :1243-1245
96. Frank RM, Brendel A (1966) Ultrastructure of the approximal dental plaque and the underlying normal and carious enamel. *Arch Oral Biol* 11:883-912
97. Gibbons RJ (1989) Bacterial adhesion to oral tissue: A model for infection diseases. *J Dent Res* 68:750-760
98. Gibbons RJ, Cohen L, Hay DJ (1986) Strains of streptococcus mutans and streptococcus sobrinus attach to different pellicle receptors. *Infect Immun* 52:555-561
99. Gibbons RJ, Etherden I (1983) Comparative hydrophobicities of bacteria and their adherence to salivary pellicles. *Infect Immun* 41:1190-1196

100. Gibbons RJ, Hay DI (1988b) Adsorbed salivary proline-rich proteins as bacterial receptors on apatic surfaces. In: Switalski LM, Hööck M, Beachey E Molecular mechanismus of microbial adhesion. 1. Aufl., Springer, New York 143-169
101. Gibbons RJ, Hay DI (1989) Adsorbed salivary acidic proline-rich proteins contribute to the adhesion of streptococcus mutans JBP to apatitic surfaces. J Dent Res 68:1303-1307
102. Gibbons RJ, Hay DI (1988a) Human salivary acidic proline-rich proteins and statherin promote the attachment of actinomyces viscosus LY 7 to apatitic surfaces. Infect Immun 56:439-445
103. Gibbons RJ, Hay DI, Cisar JO, Clark WB (1988) Adsorbed salivary proline-rich protein I and statherin: receptors for type 1 fimbriae of Actinomyces viscosus T14V-J1 on apatitic surfaces. Infect Immun 56:2990-2993
104. Gibbons RJ, Hay DI, Schlesinger DH (1991) Delineation of a segment of adsorbed salivary acidic proline-rich proteins which promotes adhesion of Streptococcus gordonii to apatitic surfaces. Infect Immun 59:2948-2954
105. Gibbons RJ, Quershi IV (1978) Selective binding of blood group reactive salivary mucins by streptococcus mutans and other oral organisms. Infect Immun 22:665-671
106. Gibbons RJ, Spinell DM (1970) Salivary induced aggregation of plaque bacteria. In: Mc Hugh WD : Dental Plaque. 1. Aufl., D. & S. Livingstone, Edinburgh 207-216
107. Gibbons RJ, Van Houte J (1975) Bacterial adherence in oral microbial ecology. Ann Rev Microbiol 29:19-44
108. Gildenhuis RR, Stallard RE (1975) Comparison of plaque accumulation on metal restorative surfaces. Dent Surv 51:56-59

109. Glantz PO (1969) On wettability and adhesiveness. *Odontol Rev* 20:1-132
110. Glantz PO (1977) Adhesion to teeth. *Int Dent J* 27:324-332
111. Glantz PO (1980) Adhesion to the surfaces of teeth. In: Leach SA *Dental plaque and surface interactions in the oral cavity*. 1. Aufl., IRL Press Ltd., London 49-64
112. Glantz PO, Jendresen MD, Baier RE (1982) On clinical registrations of contact angles. In: Frank RM, Leach SA *Surface and colloid phenomena in the oral cavity: methodological aspects*. 1. Aufl., IRL Press Ltd., London 119-128
113. Glassmann MD, Miller I (1984) Antibacterial properties of one conventional and three high copper dental amalgams. *J Prosthet Dent* 52:199-203
114. Göcke R, Rerath F, Von Schwanewede H (2002) Quantitative determination of salivary components in the pellicle on PMMA denture base material. *Clin Oral Investig* 6:227-235
115. Gong KE, Ouyang T, Herzberg MC (1998) A streptococcal adhesion system for salivary pellicle and platelets. *Infect Immun* 66:5388-5392
116. Gong K, Mailloux L, Herzberg MC (2000) Salivary film expresses a complex, macromolecular binding site for *Streptococcus sanguis*. *J Biol Chem* 275:8970-8974
117. Grimm WD, Georgi K, Budde E (1989) Mikrobiell bedingte Plaqueakkumulation an verschiedenen Dentalwerkstoffen. *Quintessenz* 40:1133-1141

118. Gristina AG, Naylor PT, Myrvik Q (1988) The race for the surface: microbes, tissue cells and biomaterials. In: Switalski L, Höök M, Beachy E Molecular mechanisms of microbial adhesion. 1. Aufl., Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg 177-211
119. Grössner-Schreiber B, Griepentrog M, Haustein I, Müller WD, Lange KP, Briedigkeit H, Gobel UB (2001) Plaque formation on surface modified dental implants. An in vitro study. Clin Oral Implant Res 12:543-551
120. Grössner-Schreiber B, Hannig M, Duck A, Griepentrog M, Wenderoth DF (2004) Do different implant surfaces exposed in the oral cavity of humans show different biofilm compositions and activities? Eur J Oral Sci 112:516-522
121. Guan YH, Lath DL, Graaf T, Lilley TH, Brook AH (2003) Moderation of oral bacterial adhesion on saliva-coated hydroxyapatite by polyaspartate. J Appl Microbiol 94:456-461
122. Hahn R, Netuschil L, Löst C (1992) Initiale Plaquebesiedelung keramischer Restaurationsmaterialien. Dtsch Zahnärztl Z 47:330-334
123. Hahn R, Weiger R, Netuschil L, Bruch M (1993) Microbial accumulation and vitality on different restorative materials. Dent Mater 9:312-316
124. Hahn Berg IC, Kalfas S, Malmsten M, Arnebrant T (2001) Proteolytic degradation of oral biofilms in vitro and in vivo: potential of proteases originating from *Euphausia superba* for plaque control. Eur J Oral Sci 109:316-324
125. Hannig C, Attin T, Hannig M, Henze E, Brinkmann K, Zech R (2004) Immobilisation and activity of human  $\alpha$ -amylase in the acquired enamel pellicle. Arch Oral Biol 49:469-475

126. Hannig C, Becker K, Häusler N, Hoth-Hannig W, Attin T, Hannig M (2007) Protective effect of the in situ pellicle on dentin erosion-an ex vivo pilot study. *Arch Oral Biol* 52:444-449
127. Hannig C, Berndt D, Hoth-Hannig W, Hannig M (2009) The effect of acidic beverages on the ultrastructure of the acquired pellicle – an in situ study. *Arch Oral Biol* (in press)
128. Hannig C, Hannig M (2009) The oral cavity – a key system to understand substratum – dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Invest* 13:123-139
129. Hannig C, Hannig M, Attin T (2005) Enzymes in the acquired enamel pellicle. *Eur J Oral Sci* 113:2-13
130. Hannig C, Ruggeri A, Al-Khayer B, Schmitz P, Spitzmüller B, Deiming D, Huber K, Hoth-Hannig W, Bowen WH, Hannig M (2008) Electron microscopic detection and activity of Glucosyltransferase B, C and D in the in situ formed pellicle. *Arch Oral Biol* 53:1003-1010
131. Hannig C, Spitzmüller B, Hannig M (2009) Characterization of lysozyme activity in the in situ pellicle using a fluorimetric assay. *Clin Oral Invest* 13:15-21
132. Hannig C, Spitzmüller B, Knausenberger S, Hoth-Hannig W, Hellwig E, Hannig M (2008) Detection and activity of peroxidase in the in situ formed pellicle, *Arch Oral Biol* 53:849-858
133. Hannig C, Spitzmüller B, Miller M, Hellwig E, Hannig M (2008) Intrinsic enzymatic crosslinking and maturation of the in situ pellicle, *Arch Oral Biol* 53:416-412

134. Hannig C, Huber K, Lambrichts I, Gräser J, D`Haen J, Hannig M (2007) Detection of  $\alpha$ -amylase and lysozyme exposed on the pellicle formed in situ on different materials. *J Biomed Mater Res A* 83: 98-103
135. Hannig C, Hoch J, Becker K, Hannig M, Attin T (2005) Lysozyme activity in the initially formed in situ pellicle. *Arch Oral Biol* 50:821-828
136. Hannig C, Wasser M, Becker K, Hannig M, Huber K, Attin T (2006) Influence of different restorative materials on lysozyme and amylase activity of the salivary pellicle in situ. *J Biomed Mater Res* 78:755-761
137. Hannig C, Zech R, Henze E, Dreier S, Attin T (2005) Peroxidase release into saliva from five different home bleaching systems in vivo. *Am J Dent* 18:13-18
138. Hannig M (1997) Transmission electron microscopic study of in vivo pellicle formation on dental restorative materials. *Eur J Oral Sci* 105:422-433
139. Hannig M (1998) Elektronenmikroskopische Untersuchungen der initialen Bioadhäsionsprozesse an Festkörperoberflächen in der Mundhöhle. Habilitationsschriften der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Quintessenz Verlags-GmbH, Berlin
140. Hannig M (1999) Transmission electron microscopy of early plaque formation on dental materials in vivo. *Eur J Oral Sci* 107:55-64
141. Hannig M (1999) Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. *Clin Oral Invest* 3:88-95
142. Hannig M (2002) The protective nature of the salivary pellicle. *Int Dent J* 52:417-423
143. Hannig M, Balz M (1999) Influence of in vivo formed salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res* 33:372-379

144. Hannig M, Balz M (2001) Protective properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion. *Caries Res* 35:142-148
145. Hannig M, Bößmann K (1989) Pellicula dentis – Ultrastrukturelle Vielfalt als Ausdruck komplexer Bildung und Reifung. Teil 1. *Quintess Zahnärztl Lit* 40:1319-1327
146. Hannig M, Bößmann K (1989) Pellicula dentis – Ultrastrukturelle Vielfalt als Ausdruck komplexer Bildung und Reifung. Teil 2. *Quintess Zahnärztl Lit* 40:1485-1489
147. Hannig M, Hannig C (2007) Der initiale orale Biofilm – pathogen oder protektiv? *Oralprophylaxe und Kinderzahnheilkunde* 29:73-82
148. Hannig M, Döbert A, Stigler R, Müller U, Prokhorova S (2004) Initial salivary pellicle formation on substrates studied by AFM. *J Nanosci Nanotech* 4:532-538
149. Hannig M, Fiebiger M, Güntzer M, Döbert A, Zimehl R, Nekrashevych Y (2004) Protective effect of the in situ formed short-term salivary pellicle. *Arch Oral Biol* 49:903-910
150. Hannig M, Hannig C (2007) Does a dental biofilm, free of bacteria, exist in situ? *Journal de Parodontologie & d'Implantologie Orale* 26:187-200
151. Hannig M, Herzog S, Willigeroth SF, Zimehl R (2001) Atomic force microscopy investigation of salivary pellicle formed on enamel and glass in vivo. *Colloid Polym Sci* 279:479-483
152. Hannig M, Hess NJ, Hoth-Hannig W, de Vrese M (2003) Influence of salivary pellicle formation time on enamel demineralization – an in situ pilot study. *Clin Oral Invest* 7:158-161

153. Hannig M, Joiner A (2006) The structure, function and properties of the acquired pellicle. In: Duckworth R (Hrsg.): Monogr Oral Sci 29:29-64
154. Hannig M, Kriener L, Hoth-Hannig W, Becker-Willinger C, Schmidt H (2007) Influence of nano-composite surface coating on biofilm formation in situ. J Nanosci Nanotechnol 7:4642-4648
155. Hannig M, Khanafer A, Hoth-Hannig W, Acil Y (2002) A method for stepwise removal and analysis of the in vivo-formed salivary pellicle layer. J Dent Res 81 (Spec. Iss. B) 287 (Abstr. No. 220)
156. Hannig M, Khanafer A, Hoth-Hannig W, Al-Marrawi F, Açil Y (2005) Transmission electron microscopy comparison of methods for collecting in situ formed enamel pellicle. Clin Oral Invest 9:30-37
157. Hay DI (1967) The adsorption of salivary proteins on hydroxyapatite and enamel. Arch Oral Biol 12:937-946
158. Hay DI (1969) Some observations on human saliva proteins and their role in the formation of the acquired enamel pellicle. J Dent Res (Supplement) 48:806-810
159. Hay DI (1973) The interaction of human parotid salivary proteins with hydroxyapatite. Arch Oral Biol 18:1517-1529
160. Hay DI, Gibbons RJ, Spinell DM (1971) Characteristics of some high molecular weight constituents with bacterial aggregating activity from whole saliva and dental plaque. Caries Res 5:111-123
161. Hay DI, Moreno EC (1979) Differential adsorption and chemical affinities of proteins for apatitic surfaces. J Dent Res 58 (Spec Iss B):930-940

162. Hay DI, Moreno EC, Schlesinger DH (1979) Phosphoprotein-inhibitors of calcium phosphate precipitation from salivary secretions. *Inorg Perspect Biol Med* 2:271:285
163. Hellwig E, Klimek J, Attin T (1999) Einführung in die Zahnerhaltung. 2. Auflage, Urban und Fischer, München-Jena
164. Hiroi T, Fukushima K, Kanatake I, Namiki Y, Ikeda T (1992) De novo glucan synthesis by mutans streptococcal glycosyltransferases present in pellicle promotes firm binding of *Streptococcus gordonii* to tooth surfaces. *FEMS Microbiol Lett* 96:193-198
165. Hlady V, Reinecke DR, Andrade JD (1986) Fluorescence of adsorbed protein layers. *J Colloid Interface Sci* 111:555-569
166. Hoffmann AS (1982) Blood-biomaterial interactions: An overview. *Adv Chem Ser* 199:3-8
167. Hoog SD, Embery G (1979) The isolated and partial characterization of a sulphated glycoprotein from human whole saliva which aggregates strains of *Streptococcus sanguis* but not *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 24:791-797
168. Horbett TA (1982) Protein adsorption on biomaterials. *Adv Chem Ser* 199:233-244
169. Hörsted-Bindslev P, Larsen MJ (1990) Release of fluoride from conventional and metal-reinforced glass-ionomer cements. *Scand J Dent Res* 98:451-455
170. Hulbert J, Gibbons RJ (1990) Enhancement of *S. Mutans* attachment to pellicle by adsorbed proline-rich protein-1. *J Dent Res* 69:286, Abstr. No. 1435

171. Hyypä T, Paunio K (1977) The plaque-inhibiting effect of copper amalgam. *J Clin Periodont* 4:231-239
172. Iontcheva I, Oppenheim FG, Troxler RF (1997) Human salivary Mucin MG1 selectively forms heterotypic complexes with amylase, proline-rich proteins, statherin, and histatins. *J Dent Res* 76:734-743
173. Jendresen MA, Glantz PO (1980) Clinical adhesiveness of the tooth surfaces. *Acta Odontol Scand* 38:379-383
174. Jendresen MA, Glantz PO (1981) Clinical adhesiveness of selected dental materials. *Acta Odontol Scand* 39:39-45
175. Jenkinson HK, Lamont RJ (1997) Streptococcal adhesion and colonization. *Crit Rev Oral Biol Med* 8:175-200
176. Jensen JL, Lamkin MS, Oppenheim FG (1992) Adsorption of human salivary proteins to hydroxyapatite : A comparison between whole saliva and glandular salivary secretions. *J Dent Res* 71:1569-1576
177. Jensen ÖE, Schultes AM, Handelman SL, Proskin HM (1989) Plaque retention on Dicor crowns and gingival health over 4 years. *J Dent Res* 68:323, Abstr. No. 1129
178. Johansson I, Bratt P, Hay DI, Schluckebier S, Stromberg N (2000) Adhesion of candida albicans, but not candida krusei, to salivary statherin and mimicking host molecules. *Oral Microbiol Immunol* 15:112-118
179. Johnsson M, Richardson CF, Bergey EJ, Levine MJ, Nancollas GH (1991) The effects of human salivary cystatins and statherin on hydroxyapatite crystallization. *Arch Oral Biol* 36:631-636

180. Joiner A, Schwarz A, Philpotts C, Cox TF, Huber K, Hannig M (2008) The protective nature of pellicle towards toothpaste abrasion on enamel and dentine. *J Dent* 36:360-368
181. Karlson P, Doenecke D, Fuchs G, Koolman J, Schäfer G (1988) *Kurzes Lehrbuch der Biochemie*. 13. Auflage, Thieme, Stuttgart - New York
182. Kasemo B, Lausmaa J (1986) Surface science aspects on inorganic biomaterials. *CRC Crit Rev Biocompat* 2:335-380
183. Kashket S, Donaldson CG (1972) Saliva-induced aggregation of oral streptococci. *J Bacteriol* 112:1127-1133
184. Kautsky MB, Featherstone JD (1993) Effect of salivary components on dissolution rates of carbonated apatites. *Caries Res* 27:373-377
185. Kawai R, Takeshige M, Torii M, Tsuchitani Y (1990) Inhibition of streptococcus sobrinus adherence to fluoride releasing resin. *J Dent Res* 69:365, Abstr. No. 2050
186. Kishimoto E, Hay DJ, Gibbons RJ (1989) A human salivary protein which promotes adhesion of streptococcus mutans serotype c strains to hydroxyapatite. *Infect Immun* 57:3702-3707
187. Kishimoto E, Hay DI, Kent R (1990) polymorphism of submandibular-sublingual salivary proteins which promote adhesion of streptococcus mutans, serotyp-c-strains to hydroxyapatite. *J Dent Res* 69:1741-1745
188. Kohavi D, Klinger A, Steinberg D, Sela MN (1995) Adsorption of salivary proteins onto prosthetic titanium components. *J Prosthet Dent* 74:531-534

189. Koidis PT, Schroeder K, Johnsten W, Campagni W (1991) Color consistency, plaque accumulation and external marginal surface characteristics of the collaeless metal-ceramic restoration. *J Prosthet Dent* 65:391-400
190. Kousvelari EE, Baratz RS, Burke B, Oppenheim FG (1980) Immunochemical identification and determination of proline-rich proteins in salivary secretions, enamel pellicle, and glandular tissue specimens. *J Dent Res* 59:1430-1438
191. Krämer A, Netuschil L, Simonis A (1990) Plaqueanlagerung an verschiedenen Verblendkunststoffen – eine klinische Studie. *Dtsch Zahnärztl Z* 45:482-484
192. Krämer A, Weber H, Geis-Gerstorfer J (1989) Plaqueansammlung an Implantat- und prothetischen Werkstoffen – eine klinische Studie. *Z Zahnärztl Implantol* 5:283-286
193. Kraus FW, Mestecky J (1976) Salivary proteins and the development of dental plaque. *J Dent Res* 55:149-152
194. Kraus FW, Ørstavik D, Hurst DC, Cook CH (1973) The acquired pellicle: variability and subject-dependence of specific proteins. *J Oral Path* 2:165-173
195. Krekeler G, Kappert H, Pelz K, Graml B (1984) Die Affinität der Plaque zu verschiedenen Werkstoffen. *Schweiz Mschr Zahnheilkd* 94:647-651
196. Krekeler G, Pelz K, Rediker M (1990) Die Plaqueanhaftung an verschiedenen Implantatwerkstoffen. *Z Zahnärztl Implantol* 6:191-194
197. Kuboki Y, Teraoka K, Okada S (1987) X-ray photoelectron spectroscopic studies of the adsorption of salivary constituents on enamel. *J Dent Res* 66:1016-1019

198. Laible NJ, Germaine GR (1985) Bactericidal activity of human lysozyme, muramidase-inactive lysozyme, and cationic polypeptides against *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus faecalis*: inhibition by chitin oligosaccharides. *Infect Immun* 48:720-728
199. Lamkin MS, Arancillo AA, Oppenheim FG (1996) Temporal and compositional characteristics of salivary protein adsorption to hydroxyapatite. *J Dent Res* 75:803-808
200. Lamkin MS, Migliari D, Yao Y, Troxler RR, Oppenheim FG (2001) New in vitro model for the acquired enamel pellicle: Pellicles formed from whole saliva show inter-subject consistency in protein composition and proteolytic fragmentation patterns. *J Dent Res* 80:385-388
201. Lamkin MS, Oppenheim FG (1993) Structural features of salivary function. *Crit Rev Oral Biol Med* 4:251-259
202. Lam Watt S, Bennick A (1981) Composition of enamel and root pellicles from parotid saliva. *J Dent Res* 60:653, Abstr. No. 1375
203. Larato DC (1972) Influence of a composite resin on the gingiva. *J Prosthet Dent* 28:402-407
204. Leach SA, Critchley P, Kolendo AB, Saxton CA (1967) Salivary glycoproteins as components of the enamel integuments. *Caries Res* 1:104-111
205. Leach SA, Saxton CA (1966) An electron microscopic study of the acquired pellicle and plaque formed on the enamel of human incisors. *Arch Oral Biol* 11:1081-1094
206. Lee SJ, Kho HS, Lee SW, Yang WS (2001) Experimental salivary pellicles on the surface of orthodontic materials. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1:59-66

207. Lee SY, Kim KK, Choe SJ (2001) Binding of oral streptococci to human fibrinogen. *Oral Microbiol Immunol* 16:88-93
208. Leinonen J, Kivelä J, Parkkila S, Parkkila AK, Rajaniemi H (1999) Salivary carbonic anhydrase isoenzyme VI is located in the human enamel pellicle. *Caries Res* 33:185-190
209. Lenander-Lumikari M, Tenovuori J, Mikola H (1993) Effects of a lactoperoxidase system-containing toothpaste on levels of hypothiocyanite and bacteria in saliva. *Caries Res* 27:285-291
210. Lenander-Lumikari M, Loimaranta V (2000) Saliva and dental caries. *Adv Dent Res* 14:40-47
211. Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG (2000) Saliva and dental pellicle-a review. *Adv Dent Res* 14:22-28
212. Lenz H (1967) Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Schmelzoberhäutchen (SOH): 2. Das Schmelzoberhäutchen von durchgebrochenen Zähnen. *Dtsch Zahnärztl Z* 22:1466-1482
213. Leonhardt A, Olsson J, Dahlen G (1995) Bacterial colonization on titanium, hydroxyapatite and amalgam surfaces in vivo. *J Dent Res* 74:1607-1612
214. Levine MJ, Tabak LA, Reddy M, Mandel ID (1985) Nature of salivary pellicles in microbial adherence: role of salivary mucins. In: Mergenhagen SE, Rosan B *Molecular basis of oral microbiol adhesion*. 1. Aufl., American Society for Microbiology, Washington 125-130
215. Levine MJ, Reddy MS, Tabak LA, Loomis RE, Bergey EJ, Jones PC, Cohen RE, Stinson MW, Al-Hashimi I (1987) Structural aspects of salivary glycoproteins. *J Dent Res* 66:436-441

216. Li J, Helmerhorst EJ, Corley RB, Luus LE, Troxler RF, Oppenheim FG (2003) Characterisation of the immunologic responses to human in vivo acquired enamel pellicles as a novel means to investigate its composition. *Oral Microbiol Immunol* 18:183-191
217. Li J, Helmerhorst EJ, Troxler RF, Oppenheim FG (2004) Identification of in vivo pellicle constituents by analysis of serum immune response. *J Dent Res* 83:60-64
218. Lie T (1975) Pellicle formation on hydroxyapatite splint attached to the human dentition: Morphologic confirmation of the concept of adsorption. *Arch Oral Biol* 20:739-742
219. Lie T (1977) Early dental plaque morphogenesis. A scanning electron microscope study using the hydroxyapatite splint model and a low-sucrose diet. *J Periodont Res* 12:73-89
220. Lie T (1977b) Scanning and transmission electron microscope study of pellicle morphogenesis. *Scand J Dent Res* 85:217-231
221. Ligtenberg TJ, Bikker FJ, Groenink J, Tornøe I, Leth-Larsen R, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV, Holmskov U (2001) Human salivary agglutinin binds to lung surfactant protein-D and is identical with scavenger receptor protein gp-340. *Biochem J* 359:243-248
222. Liljemark WF, Bloomquist C (1996) Human oral microbial ecology and dental caries and periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med* 7:180-198
223. Liljemark WF, Fenner LJ, Bloomquist CG (1986) In vivo colonisation of salivary pellicle by haemophilus, actinomyces and streptococcus species. *Caries Res* 20:481-497

224. Lindemeyer R, Bassiouny M, Hsu S (1981) Factors affecting in vitro adherence of streptococcus mutans to composite restorations. J Dent Res 60 (Spec Iss A) 322, Abstr. No. 48
225. Listgarten MA (1999) Formation of dental plaque and other oral biofilms, in Newman HN, Wilson M (eds) Dental Plaque Revisited – Oral Biofilms in Health and Disease. Cardiff Bioline 187-210
226. Little BJ, Zsolnay A (1985) Chemical fingerprinting of adsorbed organic material on metal surfaces. J Colloid Interface Sci 104:79-86
227. Löffler EP, Petrides PE (1997) Biochemie und Pathobiochemie. 5. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, New York
228. Lundström I (1985) Protein conformation at surfaces. In: Glantz PO, Leach SA, Ericson T Oral interfacial reactions of bone, soft tissue and saliva 1. Aufl., IRL Press Ltd., Oxford 9-23
229. Ma JK, Hunjan M, Smith R, Kelly C, Lehner T (1990) An investigation into the mechanism of protection by local passive immunization with monoclonal antibodies against Streptococcus mutans. Infect Immun 58:3407-3414
230. Ma JK (1999) The caries vaccine: a growing prospect. Dent Update 26:374-380
231. Mac Pherson LM, Macfarlane TW, Weetmann DA, Stephen KW (1993) Comparison of the plaque microflora from natural and appliance-borne enamel surface. Caries Res 25:58-64
232. Mac Ritchie F (1978) Proteins at interfaces. Adv Protein Chem 32:283-303
233. Madapallimattan G, Bennick A (1989) Biologically active phosphopeptides in human whole saliva. J Dent Res 68:984, Abstr. No. 939

234. Maetani T, Miyoshi R, Nahara Y, Kawazoe Y, Hamda T (1984) Plaque accumulation on teflon-coated metal. *J Prosthet Dent* 51:353-357
235. Mansson-Rahemtulla B, Rahemtulla F, Baldone DC, Pruitt KM, Hjerpe A (1988) Purifikation and characterization of human salivary peroxidase. *Biochemistry* 27:233-239
236. Marsh PD, Bradshaw DJ (1995) Dental Plaque as a biofilm. *J Industrial Microbiol* 15:169-175
237. Marsh P, Martin MV (1999) *Oral Microbiology*, 4<sup>th</sup> Ed., Oxford, Wright
238. Mayhall CW (1970) Concerning the composition and source of the acquired enamel pellicle of human teeth. *Arch Oral Biol* 15:1327-1341
239. Mayhall CW (1975) Studies on the composition of the enamel pellicle. *Alabama J Med Sci* 12:252-271
240. Mayhall CW (1977) Amino acid composition of experimental salivary pellicles. *Journal of periodontology* 2:78-91
241. Mayhall CW (1980) Nonmineralized coverings of the enamel surface. In: Menaker L *The biologic basis of dental caries*. 1. Aufl., Harper and Row, publishers Inc., Hagerstown 148-166
242. Mayhall CW, Butler WT (1976) The carbohydrate composition of experimental salivary pellicles. *J Oral Pathol* 5:358-370
243. Mayo JW, Carlson DM (1974) Isolation and properties of four alpha-amylase isozymes from human submandibular saliva. *Arch Biochem Biophys* 163:498-506

244. McCabe RM, Donkersloot JA (1977) Adherence of Veillonella species mediated by extracellular glucosyltransferases from Streptococcus salivarius. Infect Immun 18:726-734
245. Meckel AH (1965) The formation and properties of organic films on teeth. Arch Oral Biol 10:585-597
246. Meryon SD, Johnson SG (1989) The modified model cavity method for assessing antibacterial properties of dental restorative materials. J Dent Res 68:835-839
247. Meurman JH, Frank RM (1991) Scanning electron microscopic study of the effect of salivary pellicle on enamel erosion. Caries Res 25:1-6
248. Meyer AE (1990) Dynamics of conditioning film formation on biomaterials (Doctoral Thesis). University of Lund
249. Moran J, Addy M, Newcombe R (1989) Comparison of the effect of toothpaste containing enzymes or antimicrobial compounds with a conventional fluoride toothpaste on the development of plaque and gingivitis. J Clin Periodontol 16:295-299
250. Moreno EC, Kresak M, Hay DI (1984) Adsorption of molecules of biological interest onto hydroxyapatite. Calcif Tissue Int 36:48-59
251. Moreno EC, Varughese K, Hay DI (1979) Effect of human salivary proteins on the precipitation kinetics of calcium phosphate. Calcif Tiss Int 28:7-16
252. Morge S, Adamczak E, Linden A (1989) Variation in human salivary pellicle formation on biomaterials during the day. Archs Oral Biol 34:669-674
253. Müller RF (1987) Untersuchungen zur initialen Plaquebildung auf natürlichen und künstlichen Oberflächen unter veränderten oralen Milieubelastungen. Med Habil (Promotion B), Erfurt

254. Murakami H, Sly WS (1987) Purification and characterization of human salivary carbonic anhydrase. *J Biol Chem* 262:1382-1388
255. Murray PA, Prakobphol A, Lee T, Hoover CI, Fisher SJ (1992) Adherence of oral streptococci to salivary glycoproteins. *Infect Immun* 60:31-38
256. Murty VLN, Slomiany A, Mandel S, Sengupta S, Slomiany B (1990) Acid-retardation role of tooth enamel and cementum pellicle lipids. *J Dent Res* 69:769 Abstr. No. 771
257. Nakazato G, Tsuchiya H, Sato M, Yamauchi M (1989) In vivo plaque formation on implant materials. *Int J Oral Maxillofac Implants* 4:321-326
258. Nasmyth A (1839) On the structure, physiology, and pathology of the persistent capsular investments and pulp of the tooth. *Trans R Med Chir Soc Lond* 22:310-328
259. Nieuw Amerongen AV, Oderkerk CH, Driessen AA (1987) Role of mucins from human whole saliva in the protection of tooth enamel against demineralization in vitro. *Caries Res* 21:297-309
260. Nikiforuk G (1985) Understanding dental caries. Vol 1. Etiology and mechanisms. Basic and clinical aspects. 1. Aufl., Karger, Basel 253-256
261. Norde W (1984) Adsorption of biopolymers and its relevance for particle adhesion: a physico-chemical approach. In: Ten Cate JM, Leach SA, Arends J bacterial adhesion and preventive dentistry. 1. Aufl., IRL Press Ltd., Oxford 1-17
262. Norman RD, Mehra RV, Swartz ML, Philips RW (1972) Effects of restorative materials on plaque composition. *J Dent Res* 51:1596-1601

263. Nunez LF, Schmalz G, Hembree JH (1976) Influence of amalgam, alloy and Hg on the in vitro growth of streptococcus mutans: III. Effect of specimen age and composition. J Dent Res 55:1001-1003
264. Nyvad B, Fejerskov O (1987) Scanning electron microscopy of early microbial colonization of human enamel and root surfaces in vivo. Scand J Dent Res 95:287-296
265. Nyvad B, Fejerskov O (1987) Transmission electron microscopy of early microbial colonization of human enamel and root surfaces in vivo. Scand J Dent Res 95:297-307
266. Nyvad B, Kilian M (1987) Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. Scand J Dent Res 95:369-380
267. Nyvad D, Fejerskov O (1984) Experimentally induced changes in ultrastructure of pellicle and microbial colonisation on enamel in vivo. In: Ten Cate JM, Leach SA, Arends J, Bacterial adhesion and preventive dentistry. 1. Aufl., IRL Press, Oxford 143-151
268. Olsson J, Carlén A, Holmberg K (1991) Inhibition of Streptococcus mutans adherence to hydroxyapatite with combinations of alkyl phosphates and nonionic surfactants. Caries Res 25:51-57
269. Oppenheim FG, Hay DI, Smith DJ, Offner GD, Troxler RF (1987) Molecular basis of salivary proline-rich protein and peptide synthesis: cell-free translations and processing of human and macaque statherin mRNAs and partial amino acid sequence of their signal peptides. J Dent Res 66:462-466
270. Ørstavik D (1985) Antibacterial properties of and elemental release from some dental amalgams. Acta Odontol Scand 43:231-239

271. Ørstavik D, Hensten-Pettersen A (1978) Antibacterial activity of tooth-colored dental restorative materials. *J Dent Res* 57:171-175
272. Ørstavik D, Kraus FW (1973) The acquired pellicle: Immunofluorescent demonstration of specific proteins. *J Oral Path* 2:68-76
273. Ørstavik D, Kraus FW (1974) The acquired pellicle: enzyme and antibody activities. *Scand J Dent Res* 82:202-205
274. Öste R, Rönström A, Birkehed D, Edwardsson S, Stenberg G (1981) Gas-liquid chromatography analysis of amino acids in pellicle formed on tooth surface and plastic films in vivo. *Arch Oral Biol* 26:635-641
275. Parkkila S, Kaunisto K, Rajaniemi L, Kumpulainen T, Jokinen K, Rajaniemi H (1990) Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isoenzymes VI, II, and I in human parotid and submandibular glands. *J Histochem Cytochem* 38:941-947
276. Perdok JF, Busscher HJ, Weerkamp AH, Arends J (1988) The effect of an aminofluoride-stannous fluoride containing mouthrinse on enamel surface free energy and the development of plaque and gingivitis. *Clin Prev Dent* 10:3-9
277. Pollock JJ, Denepitiya L, Mackay BJ, Iacono VJ (1984) Fungistatic and fungicidal activity of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on candida albicans. *Infect Immun* 44:702-707
278. Pollock JJ, Goodman H, Elsey PK, Iacono VJ (1983) Synergism of lysozyme, proteases and inorganic monovalent anions in the bacteriolysis of oral *Streptococcus mutans* GS5. *Arch Oral Biol* 28:865-871
279. Pollock JJ, Lotardo S, Gavai R, Grossbard BL (1987) Lysozyme-protease-inorganic monovalent anion lysis of oral bacterial strains in buffers and stimulated whole saliva. *J Dent Res* 66:467-474

280. Pollock JJ, Shoda J, McNamara TF, Cho MI, Campbell A, Iacono VJ (1984) In vitro and in vivo studies of cellular lysis of oral bacteria by a lysozyme-protease-inorganic monovalent anion antibacterial system. *Infect Immun* 45:610-617
281. Pratt-Terpstra IH, Weerkamp AH, Busscher HJ (1987) Adhesion of oral streptococci from a flowing suspension to uncoated and albumin-coated surfaces. *J Gen Microbiol* 133:3199-3206
282. Pratt-Terpstra IH, Weerkamp AH, Busscher HJ (1989) The effects of pellicle formation on streptococcal adhesion to human enamel and artificial substrata with various surface free-energies. *J Dent Res* 68:463-467
283. Pruitt KM, Adamson M (1977) Enzyme activity of salivary lactoperoxidase adsorbed to human enamel. *Infect Immun* 17:112-116
284. Pruitt KM, Caldwell RC, Jamieson AD, Taylor RE (1969) The interaction of salivary proteins with tooth surface. *J Dent Res Supplement to No 5* 48:818-823
285. Quirynen M, Bollen CML (1995) The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of literature. *J Clin Periodontol* 22:1-14
286. Quirynen M, Marechal M, Busscher H, el-Abiad M, Arends J, Van Steenberghe D (1988) The influence of surface characteristics on the early bacterial colonization of intra-oral hard surfaces. *J Clin Dent* 1 Suppl A:A14-19
287. Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Arends J, Darius PL, Van Steenberghe D (1989) The influence of surface free energy on planimetric plaque growth in man. *J Dent Res* 68:796-799

288. Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Darius PL, Van Steenberghe D (1990) The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation. An in vivo study in man. *J Clin Periodontol* 17:138-144
289. Quirynen M, van der Mei HC, Bollen CM, Schotte A, Marechal M, Doornbusch GI, Naert T, Busscher HJ, van Steeberghe D (1993) An in vivo study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology of supra- and subgingival plaque. *J Dent Res* 72:1304-1309
290. Ramasubbu N, Thomas LM, Bhandary KK, Levine MJ (1993) Structural characteristics of human salivary statherin: a model for boundary lubrication at the enamel surface. *Crit Rev Oral Biol* 4:363-370
291. Rasperini G, Maglione M, Cocconcelli P, Simion M (1998) In vivo early plaque formation on pure titanium and ceramic abutments: a comparative microbiological and SEM analysis. *Clin Oral Implants Res* 9:357-364
292. Rølla G (1989) Why is sucrose so cariogenic? The role of glucosyltransferase and polysaccharides. *Scand J Dent Res* 97:115-119
293. Rølla G, Ellingsen JE, Gaare D (1994) Polydimethylsiloxane as a tooth surface-bound carrier of triclosan: a new concept in chemical plaque inhibition. *Adv Dent Res* 8:272-277
294. Rølla G, Rykke G (1994) Evidence for presence of micelle-like protein globules in human saliva. *Colloid surface B. Biointerfaces* 3:177-182
295. Rølla G, Ciardi JE, Bowen WH (1983) Identification of IgA, IgG, lysozyme, albumin,  $\alpha$ -amylase and glucosyltransferase in the protein layer adsorbed to hydroxyapatite from whole saliva. *Scand J Dent Res* 91:186-190

296. Rönström A, Edwardsson S, Attström R (1977) Streptococcus sanguis and streptococcus salivarius in early plaque formation on plastic films. J Periodontol res 12:331-339
297. Rosan B, Lamont RJ (2000) Dental plaque formation. Microbes Infect 2:1599-1607
298. Ruan MS, Di Paola C, Mandel ID (1986) Quantitative immunochemistry of salivary proteins adsorbed in vitro to enamel and cementum from caries-resistant and caries-susceptible human adults. Arch Oral Biol 31: 597-601
299. Rudee ML, Price TM (1985) The initial stages of adsorption of plasma derived proteins on artificial surfaces in a controlled flow environment. J Biomed Mater Res 19:57-66
300. Rüdiger SG, Carlén A, Meurman JH, Kari K, Olsson J (2002) Dental biofilms at healthy and inflamed gingival margins. J Clin Periodontol 29:524-530
301. Russel MW, Childers NK, Michalek SM, Smith DJ, Taubman MA (2004) A Caries Vaccine? The state of the science of immunization against dental caries. Caries Res 38:230-235
302. Russel MW, Hajishengallis G, Childers NK, Michalek SM (1999) Secretory immunity in defense against cariogenic mutans streptococci. Caries Res 33:4-15
303. Rykke M, Smistadt G, Rølla G, Karlsen J (1995) Micelle-like structures in human saliva. Colloids Surfaces B. Biointerfaces 4:33-40
304. Rykke M, Sønju T, Rølla G (1990) Interindividual and longitudinal studies of amino acid composition of pellicle collected in vivo. Scand J Dent Res 98:129-134

305. Rykke M, Sønju T (1991) Amino acid composition of acquired enamel pellicle collected in vivo after 2 hours and after 24 hours. *Scand J Dent Res* 99:463-469
306. Sandig HC, Kleinert P, Pfister W, Endert G, Zimmermann S (1991) Die Bewertung adhäsiver Eigenschaften von Dentalmaterialien mit Hilfe radioaktiv markierter Bakterien. *Dtsch Zahn Mund Kieferheilkd* 79:375-380
307. Sandig HC, Pfister W, Rupprecht P, Rupprecht B (1984) Untersuchungen über antibakterielle Eigenschaften stomatologischer Legierungen mit unterschiedlicher Oberflächenbearbeitung. *Zahn Mund Kieferheilkd* 72:436-441
308. Sas R, Dawes C (1997) The intra-oral distribution of unstimulated and chewing-gum-stimulated parotid saliva. *Arch Oral Biol* 42:469-474
309. Savitt ED, Malament KA, Sokransky SS, Melcer AJ, Backman KJ (1987) Effects on colonization of oral microbiota by a cast glass ceramic restoration. *Int J Periodont Rest Dent* 2:23-35
310. Saxton CA (1973) Scanning electron microscope study of the formation of dental plaque. *Caries Res* 7:102-119
311. Scannapieco FA (1994) Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. *Crit Rev Oral Biol Med* 5:102-119
312. Scannapieco FA, Bergey EJ, Reddy MS, Levine MJ (1989) Characterisation of salivary  $\alpha$ -amylase binding to *Streptococcus sanguis*. *Infect Immun* 57:2853-2863
313. Scannapieco FA, Torres G, Levine MJ (1993) Salivary  $\alpha$ -amylase: Role in dental plaque and caries formation. *Crit Rev Oral Bio Med* 4:301-307

314. Scannapieco FA, Torres GI, Levine MJ (1995) Salivary amylase promotes adhesion of oral streptococci to hydroxyapatite. *J Dent Res* 74:1360-1366
315. Scheie AA, Eggen KH, Rølla G (1987) Glucosyltransferase activity in human in vivo formed enamel pellicle and in whole saliva. *Scand J Dent Res* 95:212-215
316. Scherer W, Lippman N, Kain J (1989) Antimicrobial properties of glass-ionomer cements and other restorative materials. *Oper Dent* 14:77-81
317. Schiffner U (1997) Der Einfluss von Speichelproteinen auf die Demineralisation von Zahnschmelz: Untersuchungen in einer künstlichen Mundhöhle. Hamburg, Univ., Habil.-Schr., Hanser, Wien
318. Schilling KM, Bowen WH (1988) The activity of glucosyltransferase adsorbed onto saliva-coated hydroxyapatite. *J Dent Res* 67:2-8
319. Schilling KM, Bowen WH (1992) Glucans synthesised in situ in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 60:284-295
320. Schlesinger DH, Hay DI (1986) Complete covalent structure of a prolin-rich phosphoprotein (PRP-Z), an inhibitor of calcium phosphate crystal growth from human parotid saliva. *Int J Peptide Protein Res* 27:373-379
321. Schüle H (1961) Chemische Zusammensetzung und physikalische Eigenschaften des Schmelzoberhäutchens. *Arch Oral Biol* 4:40-49
322. Schüle H (1962) Das Schmelzoberhäutchen. Untersuchungen über die morphologischen, chemischen und physikalischen Eigenschaften. 1. Aufl., Thieme, Stuttgart
323. Schüle H (1963) The enamel cuticle in incipient caries, morphological and biochemical investigations. *Int Dent J* 13:465-470

324. Schüpbach P, Neeser JR, Golliard M, Rouvet M, Guggenheim B (1996) Incorporation of caseinoglycomacropptide and caseinophosphopeptide into the salivary pellicle inhibits adherence of mutans streptococci. *J Dent Res* 75:1779-1788
325. Schüpbach P, Oppenheim FG, Lendenmann U, Lamkin MS, Yao Y, Guggenheim B (2001) Electron-microscopy demonstration of proline-rich proteins, statherins, and histatins in acquired enamel pellicles in vitro. *Eur J Oral Sci* 109:60-68
326. Siegrist BE, Brex MC, Gusberti FA, Joss A, Lang NP (1991) In vivo early human dental plaque formation on different supporting substances. A scanning electron microscopic and bacteriological study. *Clin Oral Impl Res* 2:38-46
327. Simonis A, Freesmeyer WB, Benzing U, Setz J (1989) Plaqueanlagerung an galvanokeramischen Kronen. *Dtsch Zahnärztl Z* 44:793-795
328. Simonis A, Krämer A, Netuschil L, Schlachta T, Geis-Gerstorfer J (1990) In-vivo-Korrosionsuntersuchungen an zahnärztlichen Legierungen unter Berücksichtigung des Speichel-pH-Wertes. *Dtsch Zahnärztl Z* 45:485-489
329. Siqueira W, Zhang W, Helmerhorst EJ, Gygi SP, Oppenheim FG (2007) Identification of Protein Components in *in vivo* Human Acquired Enamel Using LC-ESI-MS/MS. *J Proteome Res* 6:2152-2160
330. Skjørland KK (1973) Plaqueaccumulation on different filling materials. *Scand J Dent Res* 81:538-542
331. Skjørland KK (1976) Bacterial accumulation on silicate and composite materials. *J Biol Bucc* 4:315-322

332. Skjørland KK, Hensten-Pettersen A, Ørstavik D, Søderholm KJ (1982) Tooth colored restorative materials: Porosities and surface topography in relation to bacterial adhesion. *Acta Odontol Scand* 40:113-120
333. Skjørland KK, Sønju T (1982) Effect of sucrose rinses on bacterial colonization on amalgam and composite. *Acta Odontol Scand* 40:193-196
334. Skjørland KK, Rykke M, Sønju T (1995) Rate of pellicle formation in vivo. *Acta Odontol Scand* 53:358-362
335. Slomiany BL, Murty VLN, Mandel ID, Sengputa S, Slomiany A (1990) Effect of lipids on the lactic acid retardation capacity of tooth enamel and cementum pellicles formed in vitro from saliva of caries-resistant and caries-susceptible human adults. *Arch Oral Biol* 35:175-180
336. Slomiany BL, Murty VLN, Zdebska E, Slomiany A, Gwozdziński K, Mandel ID (1986) Tooth surface-pellicle lipids and their role in the protection of dental enamel against lactic-acid diffusion in man. *Arch Oral Biol* 31:187-191
337. Smales RJ (1981) Plaque growth on dental restorative materials. *J Dent* 9:133-140
338. Smith DJ (2002) Dental caries vaccines: prospects and concerns. *Crit Rev Oral Biol Med* 13:335-349
339. Smith DJ (2003) Caries vaccines for the twenty-first century. *J Dent Educ* 67:1130-1139
340. Soares R, Lin T, Siqueira C, Bruno L, Li X, Oppenheim F, Offner G, Troxler R (2004) Salivary micelles. Identification of complexes containing MG2, slgA, lactoferrin, amylase, glycosylated proline-rich protein and lysozyme. *Arch Oral Biol* 49:337-343

341. Socransky SS, Manganiello AD, Propas D, Oram V, Van Houte J (1977) Bacteriological studies of developing supragingival dental plaque. *J Periodontol Res* 12:90-106
342. Söderquist ME, Walton AG (1980) Structural changes in proteins adsorbed on polymer surfaces. *J Colloid Interface Sci* 75:386-397
343. Sønju Clasen AB, Hannig M, Skjørland K, Sønju T (1997) Analytical and ultrastructural studies of pellicle on primary teeth. *Acta Odontol Scand* 55:339-343
344. Sønju Clasen AB, Hannig M, Sønju T (2000) Variations in pellicle thickness – a factor in tooth wear? In: Addy M, Embery G, Edgar M, Orchardson R (eds.): *Tooth wear and sensitivity*. London, Martin Dunitz Ltd, 2000, pp. 189-194
345. Sønju T (1975) Investigation of some salivary glycoproteins and their possible role in pellicle formation. *Norske Tannlaegeforenings Tidende* 85:393-403
346. Sønju T, Christensen TB, Kornstad L, Rølla G (1974) Electron microscopy, carbohydrate analysis and biological activities of the proteins adsorbed in two hours on tooth surfaces in vivo. *Caries Res* 8:113-122
347. Sønju T, Glantz PO (1975) Chemical composition of salivary integuments formed in vivo on solids with some established surface characteristics. *Archs Oral Biol (Suppl Microbiol Abstr)* 20:687-691
348. Sønju T, Rølla G (1963) chemical analysis of the acquired pellicle formed in two hours on cleaned human teeth in vivo. Rate of formation and amino acid analysis. *Caries Res* 7:30-38
349. Sønju T, Rølla G (1972) Pellicle formation on mylar strips and other artificial surfaces. *J Periodont Res* 7 (Suppl. No. 10):20-21

350. Sønju T, Rølla G (1973) Chemical analysis of the acquired pellicle formed in two hours on cleaned human teeth in vivo. Rate of formation and amino acid analysis. *Caries Res* 7:30-38
351. Sønju T, Skjørland K (1976) Pellicle composition and initial bacterial colonization on composite and amalgam in vivo. In: Stiles HM, Loesche WJ, O'Brien TC *Microbial aspects of dental caries. Suppl Microbiol Abstr* 1:133-141
352. Sønju T, Thylstrup A, Fejerskov O (1986) *Textbook of cariology*. 1. Auflage, Munksgaard, Copenhagen
353. Steinberg D, Klinger A, Kohavi D, Sela MN (1995) Adsorption of human salivary proteins to titanium powder. I. Adsorption of human salivary albumin. *Biomaterials* 16:1339-1343
354. Steele WF, Morrison M (1969) Antistreptococcal activity of lactoperoxidase. *J Bacteriol* 97:635-639
355. Stigler RR, Carlén A, Nagursky H, Hannig M (2003) Composition of the Salivary Pellicle formed on in eight different locations of the dentition. *J Dent Res (Spec Iss B) Abstr*. No 1646, B-217
356. Stinson MW, Levine MJ, Cavese JM, Prakobphol A, Murray PA, Tabak LA, Reddy MS (1982) Adherence of streptococcus sanguis to salivary mucin bound to glass. *J Dent Res* 61:1390-1393
357. Svanberg M, Krasse M, Örnefeldt HO (1990a) Mutans streptococci in interproximal plaque from amalgam and glass ionomer restorations. *Caries Res* 24:133-136
358. Svanberg M, Mjör IA, Orstavik D (1990b) Mutans streptococci in plaque from margins of amalgam, composite, and glass-ionomer restorations. *J Dent Res* 69:861-864

359. Swift EJ (1989b) In vitro caries-inhibitory properties of a silver cermet. *J Dent Res* 68:1088-1093
360. Tabak LA (1995) In defense of the oral cavity: structure, biosynthesis, and function of salivary mucins. *Annu Rev Physiol* 57:547-564
361. Tabak LA, Levine MJ, Mandel ID, Ellison SA (1982) Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. *J Oral Pathol* 11:1-7
362. Takahashi Y, Ruhl S, Yoon JW, Sandberg AL, Cisar JO (2002) Adhesion of viridans group streptococci to sialic acid- galactose-, and N-acetylgalactosamine-containing receptors. *Oral Micro Immun* 17:257-262
363. Tatevossian A (1990) Fluoride in dental plaque and its effects. *J Dent Res* 69:645-652
364. Tellefson LM, Germaine GR (1986) Adherence of streptococcus-sanguis to hydroxyapatite coated with lysozyme and lysozyme-supplemented saliva. *Infect Immun* 51:750-759
365. Theilade E, Theilade J, Mikkelsen L (1982) Microbiological studies on early dento-gingival plaque on teeth and mylar strips in humans. *J Periodontol Res* 17:12-25
366. Tinanoff N, Brady JM, Gross A (1976a) The effect of NaF and SnF<sub>2</sub> mouthrinses on bacterial colonization of tooth enamel. TEM and SEM studies. *Caries Res* 10:415-426
367. Tinanoff N, Glick PL, Weber DF (1976) Ultrastructure of organic films on the enamel surface. *Caries Res* 10:19-32
368. Tinanoff N, Gross A, Brady JM (1976c) Development of plaque on enamel. Parallel investigations. *J Periodontol Res* 11:197-209

369. Tobias RS, Browne RM, Wilson CA (1985) Antibacterial activity of dental restorative materials. *Int Endod J* 18:161-171
370. Twetman S, Lindqvist L, Sund ML (1986) Effect of human lysozyme on 2-deoxyglucose uptake by *Streptococcus mutans* and other oral microorganisms. *Caries Res* 20:223-229
371. Turkheim HJ (1953) Bacteriological investigations on dental filling materials. *Br Dent J* 95:1-7
372. Updegraff DM, Chany WH, Joos RW (1971) Antibacterial activity of dental restorative materials. *J Dent Res* 50:382-387
373. Uyen MHWJC, Busscher HJ, Weerkamp HH, Arends J (1985) Surface free energies of oral streptococci and their adhesion to solids. *FEMS Microbiol Lett* 30:103-106
374. Vacca Smith AM, Bowen WH (2000) The effects of milk and Kappa-casein on salivary pellicle formed on hydroxyapatite discs in situ. *Caries Res* 34:88-93
375. Vacca Smith AM, Bowen WH (2000) In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. *Arch Oral Biol* 45:277-291
376. Van der Mei HC, White DJ, Kamminga-Rasker HJ, Knight J, Baig AA, Smit J, Busscher HJ (2002) Influence of dentifrices and dietary components in saliva on wettability of pellicle-coated enamel in vitro and in vivo. *Eur J Oral Sci* 110:434-438
377. Van Dijk LJ, Goldsweer, R, Busscher HJ (1988) Interfacial free energy as a driving force for pellicle formation in the oral cavity: An in vivo study in beagle dogs. *Biofouling* 1:19-25

378. Van Dijk LJ, Herkströter F, Busscher HJ, Weerkamp AH, Jansen HWB, Arends J (1987a) Surface-free energy and bacterial adhesion. – An in vivo study in beagle dogs. *J Clin Periodont* 14:300-304
379. Van Houte J (1980) Bacterial specificity in the etiology of dental caries. *Int Dent J* 30:305-326
380. Van Houte J, Gibbons RJ, Banghart SB (1970) Adherence as a determinant of the presence of streptococcus salivarius and streptococcus sanguis on the tooth surface. *Arch Oral Biol* 15:1025-1034
381. Van Houte J, Gibbons RJ, Pulkkinen AJ (1971) Adherence as an ecological determinant for streptococci in the human mouth. *Arch Oral Biol* 16:1131-1141
382. Van Loeveren C (1990) The antimicrobial action of fluoride and its role in caries inhibition. *J Dent Res* 69:676-681
383. Vassaliakos N, Arnebrandt T, Rundegren J, Glantz PO (1982) In vitro interactions of anionic and cationic surfactants with salivary fractions on well-defined solid surfaces. *Acta Odontol Scand* 50:179-188
384. Vassaliakos N, Arnebrandt T, Glantz PO (1993) An in vitro study of salivary film formation at solid / liquid interfaces. *Scand J Dent Res* 101:133-137
385. Veerman EC, Valentijn-Benz M, Van den Keybus PA, Rathman WM, Sheehan JK, Nieuw Amerongen AV (1991) Immunochemical analysis of high molecular-weight human salivary mucins (MG1) using monoclonal antibodies. *Arch Oral Biol* 36:923-932
386. Veerman EC, Van den Keybus PA, Vissink A, Nieuw Amerongen AV (1996) Human glandular salivas: their separate collection and analysis. *Eur J Oral Sci* 104:346-352

387. Vitkov L, Hannig M, Nekrashevych Y, Krautgartner W (2004) Supramolecular pellicle precursors. *Eur J Oral Sci* 112:320-325
388. Vitorino R, Calheiros-Lobo MJ, Duarte JA, Ferrer-Correia AJ, Tomer KB, Dubin JR, Domingues PM, Amado FML (2004) In vitro hydroxyapatite adsorbed salivary proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 320:342-346
389. Vitorino R, Calheiros-Lobo MJ, Duarte JA, Domingues PM, Amado FM (2008) Peptide profile of human acquired enamel pellicle using MALDI tandem MS. *J Sep Sci* 31:523-537
390. Vitorino R, Calheiros-Lobo MJ, Williams J, Correia AJF, Tomer KB, Duarte JA, Domingues PM, Amado FML (2007) Peptidomic analysis of human acquired enamel pellicle. *Biomed Chromatogr* 21:1107-1117
391. Weerkamp AH, Quirynen M, Marechal M, Van der Mei HC, Van Steenberghe D, Busscher HJ (1989) The role of surface free energy in the early in vivo formation of dental plaque on human enamel and polymeric substrata. *Microb Ecol Health Dis* 2:11-18
392. Weitman T, Eames WB (1975) Plaque accumulation on composite surfaces after various finishing procedures. *J Am Dent Ass* 91:101-110
393. Whittaker CJ, Klier CM, Kolenbrander PE (1996) Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annu Rev Microbiol* 50:513-552
394. Wilkes PD, Leach SA (1980) The interactions of submandibular salivary proteins with solid surfaces. In: Leach SA *Dental plaque and surface interactions in the oral cavity*. 1. Aufl., IRL Pres Ltd., London 287-300
395. Wise MG, Dykema RW (1975) The plaque-retaining capacity of four dental materials. *J Prosth Dent* 33:178-190

396. Wolinsky LE, De Camargo PM, Evard JC, Newman MG (1989) A study of in vitro attachment of streptococcus sanguis and actinomyces viscosus to saliva-treated titanium. *Int J Oral Maxillofac Implant* 4:27-31
397. Xu T, Levitz SM, Diamond RD, Oppenheim FG (1991) Anticandidal activity of major human salivary histatins. *Infect Immun* 59:2549-2554
398. Yao Y, Berg EA, Costello CE, Troxler RF, Oppenheim FG (2003) Identification of protein components in human acquired enamel pellicle and whole saliva using novel proteomics approaches. *J Biol Chem* 278:5300-5308
399. Yao Y, Grogan J, Zehnder M, Lendenmann U, Nam B, Wu Z, Costello CE, Oppenheim FG (2001) Compositional analysis of acquired enamel pellicle by mass spectrometry. *Arch Oral Biol* 46:293-303
400. Yao Y, Lamkin MS, Oppenheim FG (1999) Pellicle precursor proteins : acidic proline-rich proteins, statherin, and histatins, and their crosslinking reaction by oral transglutaminase. *J Dent Res* 78:1696-1703
401. Yao Y, Lamkin MS, Oppenheim FG (2000) Pellicle precursor proteins crosslinking:characterisation of an adduct between acidic proline-rich proteins (PRP1) and statherin generated by transglutaminase. *J Dent Res* 79:930-938
402. Yoshino N, Teranaka T (1997) Synthesis of silane coupling agents containing fluorocarbon chain and applications to dentistry: plaque-controlling surface modifiers. *J Biomater Sci Polym Ed* 8:623-653
403. Young A, Rykke M, Rølla G (1999) Quantitative and qualitative analyses of human salivary micelle-like globules. *Acta Odontol Scand* 57:105-110
404. Zahradnik RT (1979) Modifikation by salivary pellicles of in vitro enamel remineralization. *J Dent Res* 58:2066-2073

405. Zahradnik RT, Moreno EC, Burke EJ (1976) Effect of salivary pellicle on enamel subsurface demineralization in vitro. J Dent Res 55:664-670
406. Zahradnik RT, Propas D, Moreno EC (1997) In vitro enamel demineralization by streptococcus mutans in the presence of salivary pellicles. J Dent Res 56:1107-1110
407. Zahradnik RT, Propas D, Moreno EC (1978) Effect of salivary pellicle formation time on in vitro attachment and demineralization by streptococcus mutans. J Dent Res 57:1036-1042



## 8. Lebenslauf

<b>Name:</b>	Mario Weyland
<b>geboren:</b>	12. Mai 1972 in Püttlingen
<b>Staatsangehörigkeit:</b>	deutsch
<b>Familienstand:</b>	ledig
<b>Schul Ausbildung:</b>	
04. September 1978 – 22. Juli 1982	Grundschule Pflugscheid Riegelsberg
06. September 1982 – 16. Juni 1992	Willi-Graf-Gymnasium Saarbrücken
16. Juni 1992	Allgemeine Hochschulreife
<b>Berufsausbildung:</b>	
01. August 1992 – 04. Juli 1995	Ausbildung zum Zahntechniker Dental-Technik H. W. Greif GmbH, Riegelsberg
<b>Zivildienst:</b>	
03. Juli 1995 – 31. Juli 1996	Klinikum Saarbrücken gGmbH Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie Prof. Dr. Dr. J. Dumbach
<b>Studium:</b>	
21. Oktober 1996 – 06. Juli 2001	Zahnmedizinstudium Universität des Saarlandes
22. November 2001	Examen
14. Dezember 2001	Approbation
<b>Beschäftigung:</b>	
01. August 1996 – 13. September 1996	Zahntechniker (100% d. Arbeitszeit)
14. September 1996 – 30. September 1996	arbeitslos
01. Oktober 1996 – 31. Dezember 2001	Zahntechniker (25% d. Arbeitszeit) Klinikum Saarbrücken gGmbH Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie Prof. Dr. Dr. J. Dumbach

## 8. Lebenslauf

---

07. Januar 2002 – 30. September 2002

Vorbereitungsassistent

Praxis Dr. N. Schäfer

St. Wendel - Niederkirchen

01. Oktober 2002 – 28. Februar 2005

Wissenschaftlicher Mitarbeiter und  
Doktorand der Universität des  
Saarlandes, Klinik für Zahnerhaltung,  
Parodontologie und Präventive  
Zahnheilkunde, Prof. Dr. M. Hannig,  
Homburg

01.03.2005- 31.04.2005

arbeitslos

seit 02.05.2005

selbständig niedergelassen in eigener  
Praxis in Riegelsberg

## Materialliste

- **Mat. 1** blend-a-print Elastic-Alginat, blend-a-med Forschung Procter & Gamble GmbH, Schwalbach, Deutschland
- **Mat. 2** ESPE Impresept®, Espe Dental - Medizin GmbH & Co. KG, Seefeld, Deutschland
- **Mat. 3** Superhartgips, GC Fujirock, G-C Dental Ind. Corp., Tokyo, Japan
- **Mat. 4** Hartgips Moldano® blau stone Typ S, Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland
- **Mat. 5** Tiefziehplatten Scheu Duran® 1,0 x 125 mm, Scheu – Dental GmbH, Iserlohn, Deutschland
- **Mat. 6** Erkodent erkopress® ES 2004, Erkodent Erich Kopp GmbH, Pfalzgrafenweiler, Deutschland
- **Mat. 7** Goldprüfkörper Bio Herador® N, Heraeus - Kulzer GmbH & Co. KG, Hanau, Deutschland
- **Mat. 8** Keramikprüfkörper CEREC® VITABLOCS® Mark II, Vita Zahnfabrik Rauter GmbH & Co. KG, Bad Säckingen, Deutschland
- **Mat. 9** Diamantierte Trennscheibe Horico H 350 220, Horico, Berlin, Deutschland
- **Mat. 10** Kunststoffprüfkörper Palapress®, Heraeus – Kulzer GmbH & Co. KG, Hanau, Deutschland
- **Mat. 11** Teflonprüfkörper aus Teflonschablone, unbekannter Hersteller
- **Mat. 12** Schmelzprüfkörper, frisch extrahierte Rinderschneidezähne
- **Mat. 13** Kompositprüfkörper XRV™ Herculite®, Kerr Italia S.p.A. Scafati, Italien
- **Mat. 14** Universal Contour Strips , Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Deutschland
- **Mat. 15** UV-Lampe Astralis 5, Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein
- **Mat. 16** Glasionomierzementprüfkörper 3M ESPE Ketac™ Fil Plus Aplicap™, 3M ESPE AG, Seefeld, Deutschland
- **Mat. 17** tesafilm, tesa®AG, Hamburg, Deutschland
- **Mat. 18** Heliobond, Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein
- **Mat. 19** Liebherr premium, Liebherr Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, Deutschland

- **Mat. 20** Amalgamprüfkörper ORALLOY MAGICAP S, coltène® AG, Altstätten, Schweiz
- **Mat. 21** Glasprüfkörper Objektträger 76 x 26 mm, Menzel Gläser GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
- **Mat. 22** Titanprüfkörper Frios® 10 – 5010, FRIADENT GmbH, Mannheim, Deutschland
- **Mat. 23** Gripo Schleif- und Poliermaschine, Metkon® Gripo 2V, Bursa, Türkei
- **Mat. 24** Schleifpapier MICRO CUT®, Ø 250 mm, BUEHLER®, Düsseldorf, Deutschland
- **Mat. 25** Auflicht Stereo Zoom Mikroskop Motic® SMZ – 140, Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, Deutschland
- **Mat. 26** Alkohol Ethanol 70%, Apotheke in den Univ. Kliniken d. Saarlandes, Deutschland
- **Mat. 27** Aqua Spüllösung, Delta Select GmbH, Pfullingen, Deutschland  
- Roth Rotilabo® Spritzflasche, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- **Mat. 28** Bandelin Sonorex Super, Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
- **Mat. 29** Natriumhypochlorit 1% + 3%, A. Hedinger GmbH, Stuttgart, Deutschland
- **Mat. 30** Peha – Soft®, Einmal-Untersuchungshandschuhe, puderfrei, Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
- **Mat. 31** Zahnpinzette, London-College, 150 mm, gerieft, DA243R, Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
- **Mat. 32** PRESIDENT PLUS light body Abformmasse, coltène® AG, Altstätten, Schweiz
- **Mat. 33** Kettenbach Applifix 2, Kettenbach GmbH & Co. KG, Eschenburg, Deutschland
- **Mat. 34** Mixing Tips, coltène® AG, Altstätten, Schweiz
- **Mat. 35** KaVo ESTETICA Sensus 1066 T, KaVo Dental GmbH, Biberach, Deutschland
- **Mat. 36** Schaumstoffpellets Pele Tim No.0 , VOCO GmbH, Cuxhaven, Deutschland
- **Mat. 37** Teflonpinzette T519, Plano, Wetzlar, Deutschland

- **Mat. 38** Eppendorf Reference 1 - 10 µl, 10 – 100 µl, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- **Mat. 39** ratiolab® Pipettenspitzen, Müller, Dreieich, Deutschland
- **Mat. 40** Natriumlaurylsulfat Lösung 2%, Apotheke d. Unikliniken d. Saarlandes, Homburg, Deutschland
- **Mat. 41** Reagiergefäße Mikrotubes 1,5 ml , 39 x 10 mm, Sarstedt, Nümbrecht Deutschland
- **Mat. 42** Herma Haftetiketten 12 x 18 mm, Herma GmbH, Stuttgart, Deutschland
- **Mat. 43** Heraeus Herafreeze HFC 286 Basic, Kendro, Hanau, Deutschland
- **Mat. 44** Julabo MWB, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
- **Mat. 45** Lämmli-Puffer, Eigenherstellung Med. Biochemie, Universität d. Saarlandes, Homburg, Deutschland
- **Mat. 46** Vortex Genie 2, Scientific Industries INC., Bohemia, N.Y., 11716, USA
- **Mat. 47** Zahnsonde Nr. 9, gerade, Omnident® Dentalhandelsgesellschaft mbH, Rodgau, Deutschland
- **Mat. 48** Biofuge Primo, Heraeus, Kendro Laboratory products GmbH, Hanau Deutschland
- **Mat. 49** Beckmann Mikrofuge® Tubes 1,5 ml, Beckmann instruments, Inc. Palo Alto, USA
- **Mat. 50** Beckmann Zentrifugenrotor TLA 100.3, Beckmann instruments, Inc. Palo Alto, USA
- **Mat. 51** Beckmann Coulter Optima™ Max-E 100.000 RPM, Beckmann instruments, Inc. Palo Alto, USA
- **Mat. 52** Trichloressigsäure p. A., MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
- **Mat. 53** neolab® Eisbad 1-6031, Laborspezialprodukte, neolab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
- **Mat. 54** Eppendorf Centrifuge 5402, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- **Mat. 55** Aceton p. A., MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
- **Mat. 56** Con-1000 Evaporatorzentrifuge + Con JET Aspirator Vakuumpumpe, Fröbel Labortechnik, Wasserburg, Deutschland

- **Mat. 57** Sockel mit Hohlfräsung für Elektrophoresegele, Eigenbau Med. Biochemie, Univ. d. Saarlandes, Homburg, Deutschland
- **Mat. 58** Glasplatten für Elektrophoresegele, Glaserei Peter Wenzel, München, Deutschland
- **Mat. 59** Teflonspacer für Elektrophoresegele, Eigenbau Med. Biochemie, Univ. d. Saarlandes, Homburg, Deutschland
- **Mat. 60** Halteklammern für Elektrophoresegele, Mauly® Foldback-Klemmer 51, Jakob Maul GmbH, Kirchen, Deutschland
- **Mat. 61** 21er Teflonkamm für Elektrophoresegele, Eigenbau Med. Biochemie, Univ. d. Saarlandes, Homburg, Deutschland
- **Mat. 62** Bacto-Agar, DIFCO Laboratories, Detroit, USA
- **Mat. 63** Mikrowelle Intellowave LG MS-197H, LG Electronics Deutschland GmbH, Willich, Deutschland
- **Mat. 64** Becherglas, Schott Duran, Schott AG, Mainz, Deutschland
- **Mat. 65** VWR™Magnetrührstäbchen, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
- **Mat. 66** Magnetrührer IKA Combimag RCT, Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen Breisgau, Deutschland
- **Mat. 67** Acrylamid 4 x 40%, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
- **Mat. 68** Bisacrylamid 2%, sterilfiltriert, N`N-Methylene-bisacrylamide 2 x 2%, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
- **Mat. 69** 1,875 M Tris pH 8,8 mit HCL, Tris(hydroxymethyl)aminomethan, MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
- **Mat. 70** Millipore-H<sub>2</sub>O, Milli Q® Water purification system, Millipore Corporation, Bedford Massachusetts, USA
- **Mat. 71** SDS, Dodecylsulfate Na-salt, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
- **Mat. 72** TEMED, N, N, N`, N`-Tetramethylethylendiamin, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
- **Mat. 73** 20% AMPS, Amoniumpersulfat, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
- **Mat. 74** 1-Butanol, MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
- **Mat. 75** Filterpapier, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland

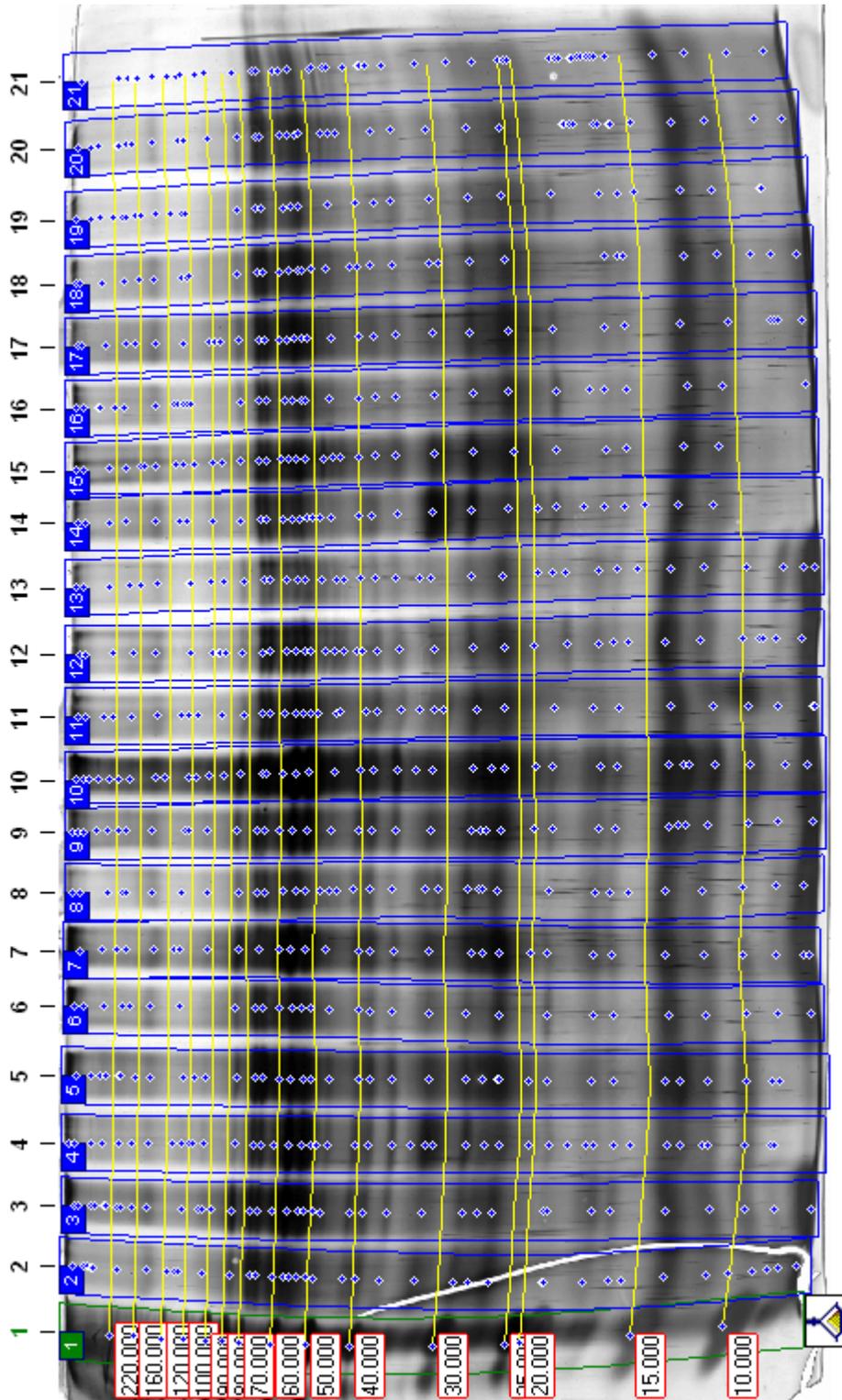
- **Mat. 76** Glaspipetten 5 + 10 ml, Hirschmann® EM Techcolor, Hirschmann® Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
- **Mat. 77** Pipettierhilfe, Automatic Sarpette® DESAGA, Sarstedt Gruppe Drummond scientific Co. Broomall, PA., USA
- **Mat. 78** 1M Tris pH 6,8, aus Tris(hydroxymethyl)aminomethan, MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
- **Mat. 79** Parafilm "M"® Laboratory Film, American CAN COMPANY, Greenwich, Großbritannien
- **Mat. 80** Eppendorf Centrifuge 5415 C, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- **Mat. 81** Eppendorf Thermostat 5320, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- **Mat. 82** Elektrophoreseapparatur, Eigenbau Med. Biochemie, Univ. d. Saarlandes, Homburg, Deutschland
- **Mat. 83** Stromgeber, Pharmacia Biotech Electrophoresis Power Supply EPS 3500, Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Schweden
- **Mat. 84** Laufpuffer, Eigenherstellung Med. Biochemie, Universität d. Saarlandes, Homburg, Deutschland
- **Mat. 85** Hamilton Microliter® Syringe, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
- **Mat. 86** BenchMark™ Protein Ladder, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- **Mat. 87** Coomassiefärbelösung, Eigenherstellung Med. Biochemie, Universität d. Saarlandes, Homburg, Deutschland
  - Brilliant Blue G, SIGMA – Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
  - SERVA Blue R, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
- **Mat. 88** Kreis-Schüttler, GFL 3019, Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
- **Mat. 89** Entfärber I, Eigenherstellung Med. Biochemie, Universität d. Saarlandes, Homburg, Deutschland
- **Mat. 90** Entfärber II, Eigenherstellung Med. Biochemie, Universität d. Saarlandes, Homburg, Deutschland

- **Mat. 91** Ethanol 99%, Zentrales Chemikalienlager Universität d. Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland
- **Mat. 92** Essigsäure 99%, Zentrales Chemikalienlager Universität d. Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland
- **Mat. 93** Glutardialdehyd 25%, MERCK-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
- **Mat. 94** Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 12,5%, Natriumcarbonat, MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
- **Mat. 95** Silbernitrat p. A., MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
- **Mat. 96** Formaldehyd 37%, MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
- **Mat. 97** Glycerin 87%, MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
- **Mat. 98** Rocky® Wippe, Typ RT-1S, Fröbel Labortechnik, Wasserburg, Deutschland
- **Mat. 99** Cellophanfolie 0,023 mm, Pütz Folien, Taunusstein Wehen, Deutschland
- **Mat. 100** Trockenrahmen, Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
- **Mat. 101** Durchlichtscanner Epson Expression 1680 Pro, Seiko Epson® Corp., Japan
- **Mat. 102** ImageMaster™ LabScan Version 3.01  
Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Schweden
- **Mat. 103** ImageMaster™ 1D Elite Version 4.10c  
Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Schweden

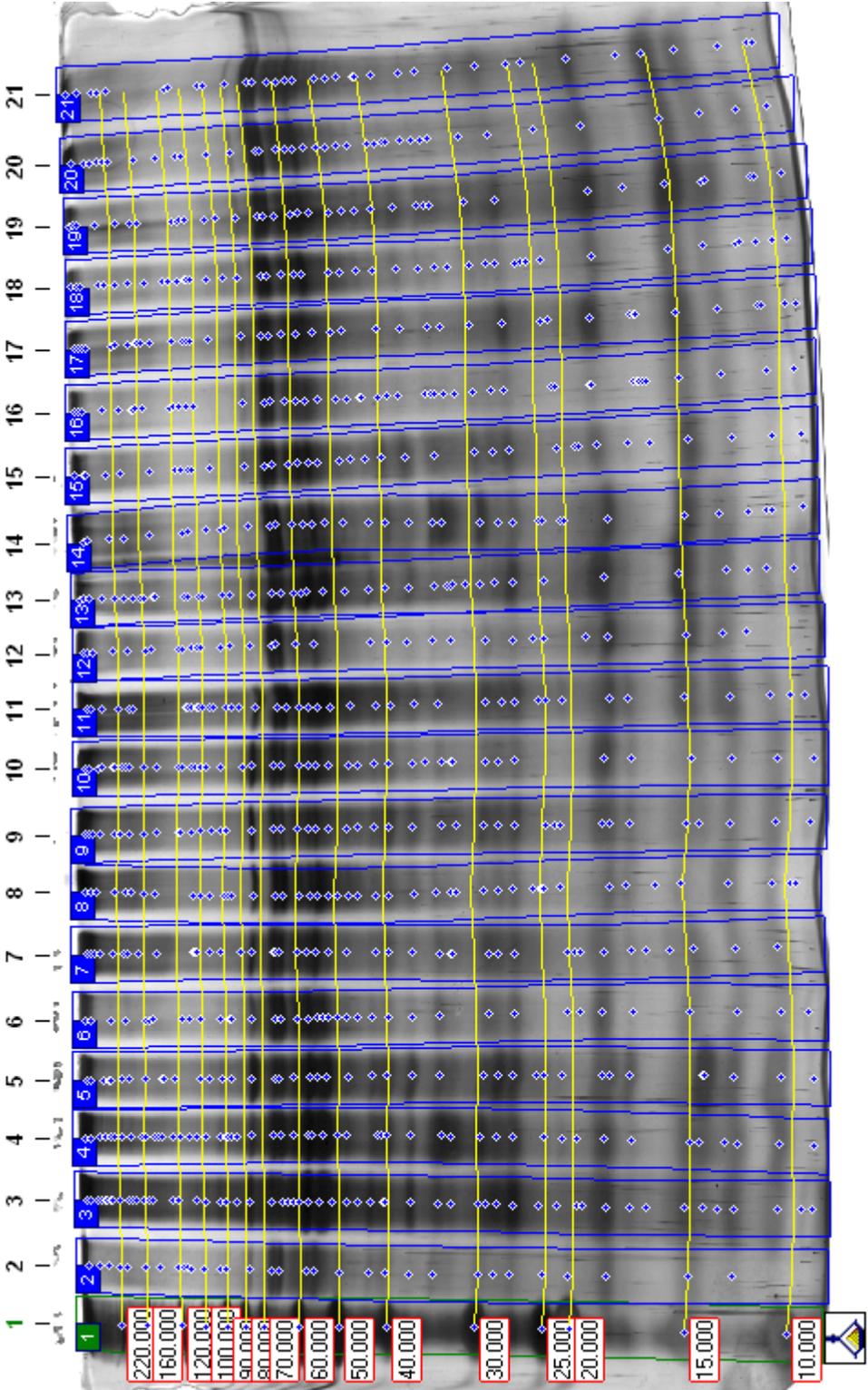
**Gel 01:  
Proband 1  
3 Minuten**

**Gele 01 – 18:**

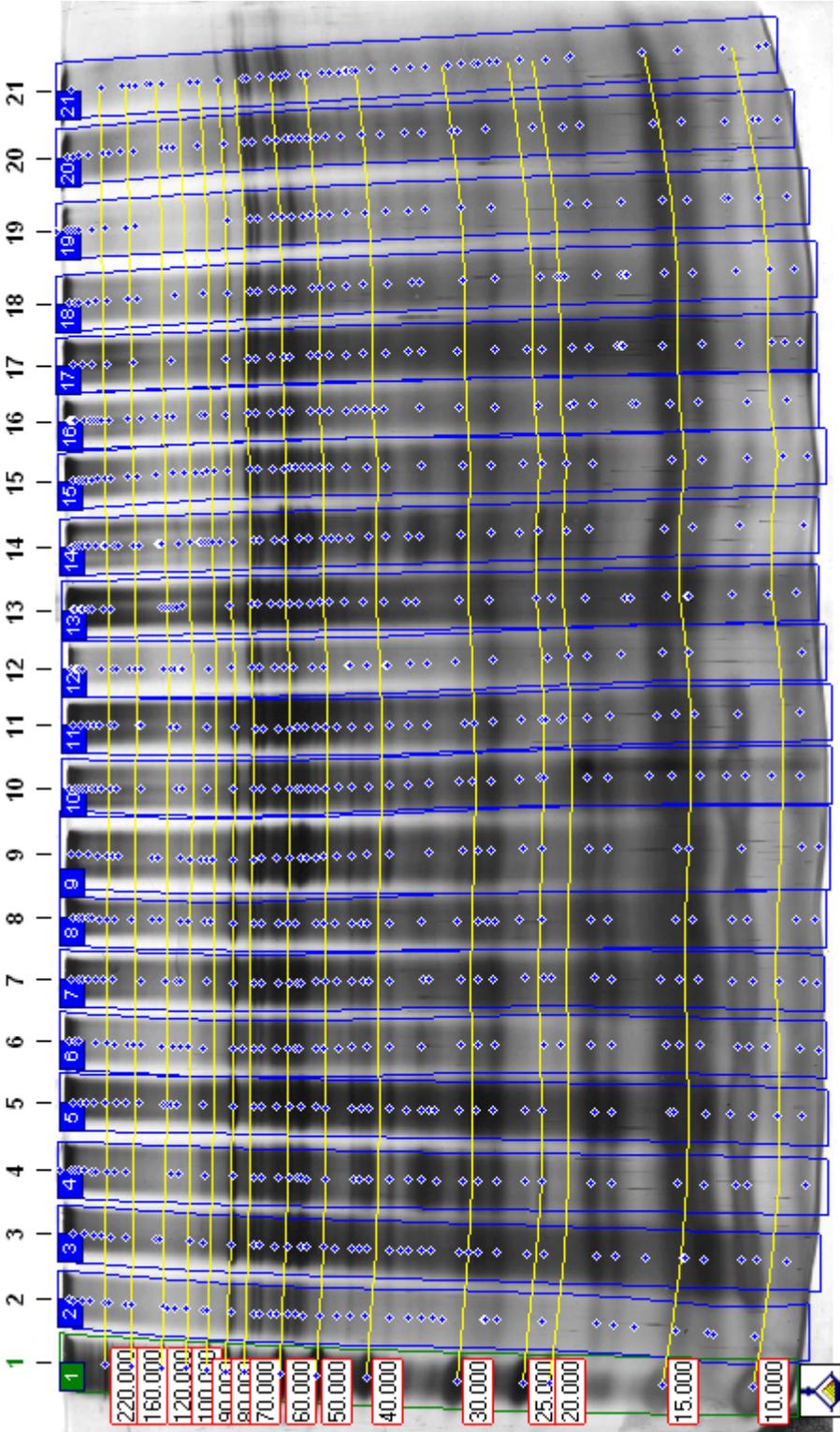
Dargestellt sind die gescannten Elektrophoresegele der 6 Probanden mit den aufgetrennten Banden der von den 10 verschiedenen Prüfkörpern gewonnenen Pellikelproteine zu den jeweils 3 Expositionszeiten. Spur 1 ist jeweils der Bench-Marker (10-220 kDa), die Spuren 2 – 11 sind die aufgetrennten Proben der bukkal getragenen Werkstoffe und die Spuren 12 – 21 die der palatinal getragenen Prüfkörper. Die Punkte stellen von der Analysesoftware detektierte Banden dar. Vergl. S. 92, 95 - 97



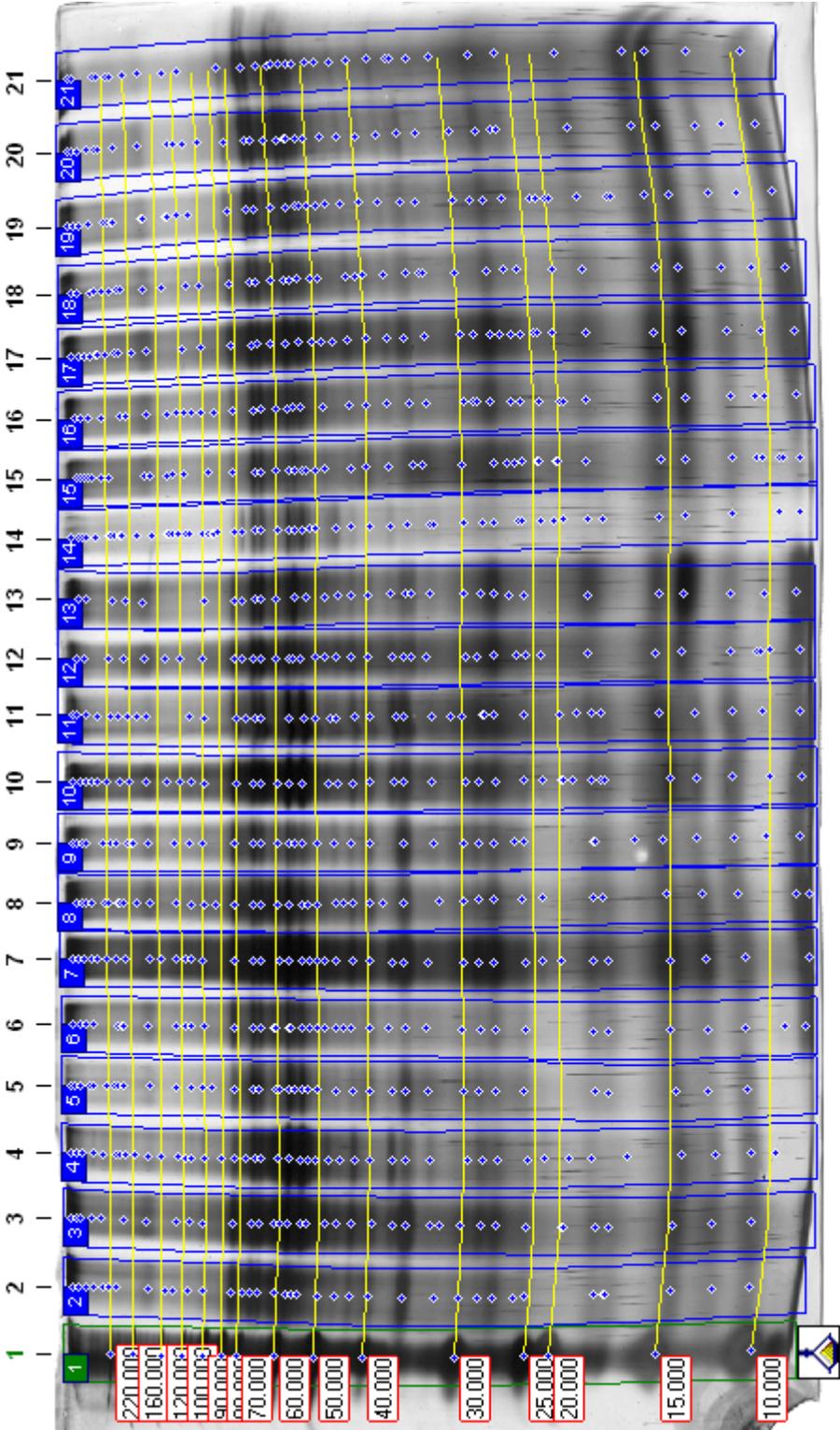
**Gel 02:  
Proband 1  
30 Minuten**



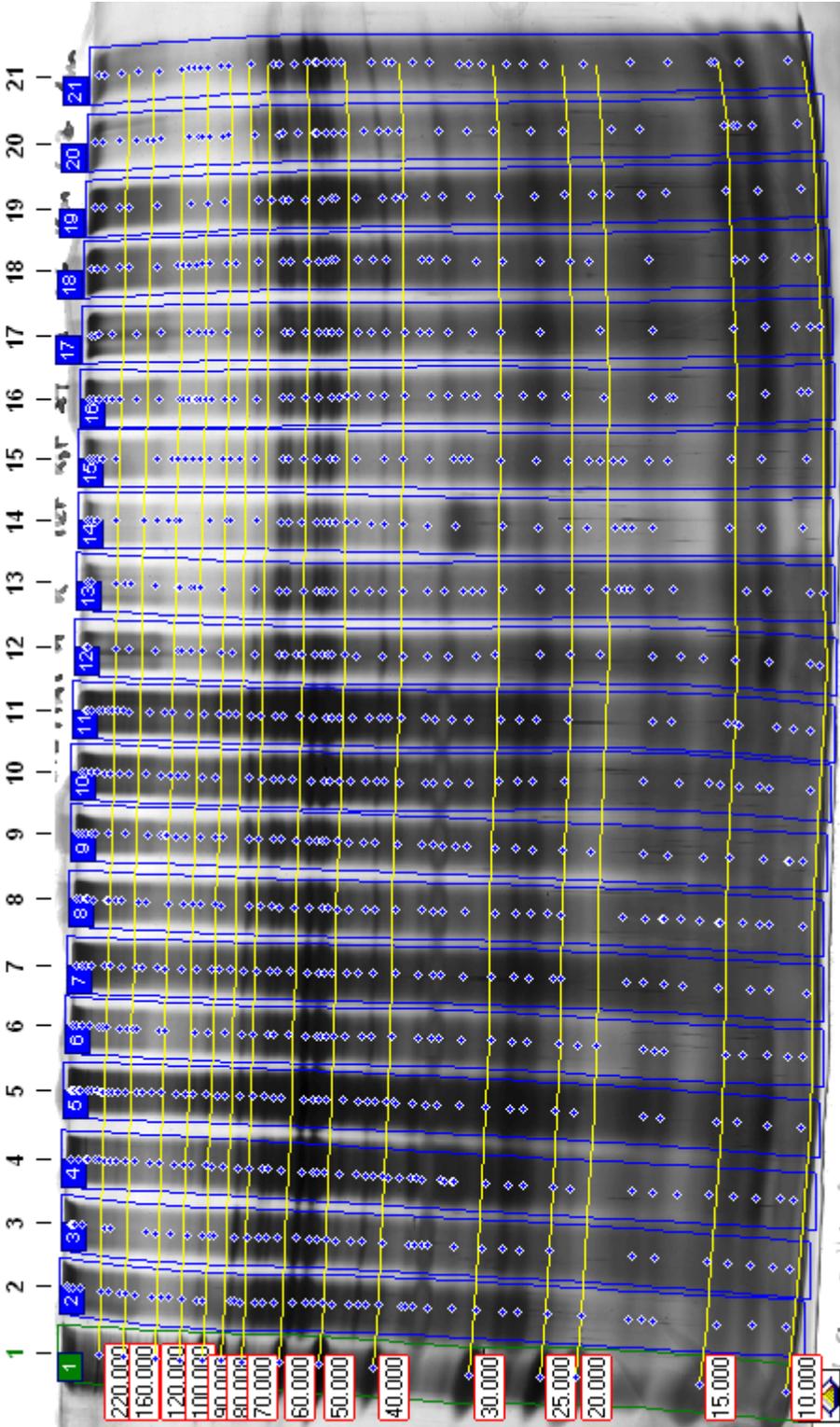
**Gel 03:**  
**Proband 1**  
**120 Minuten**



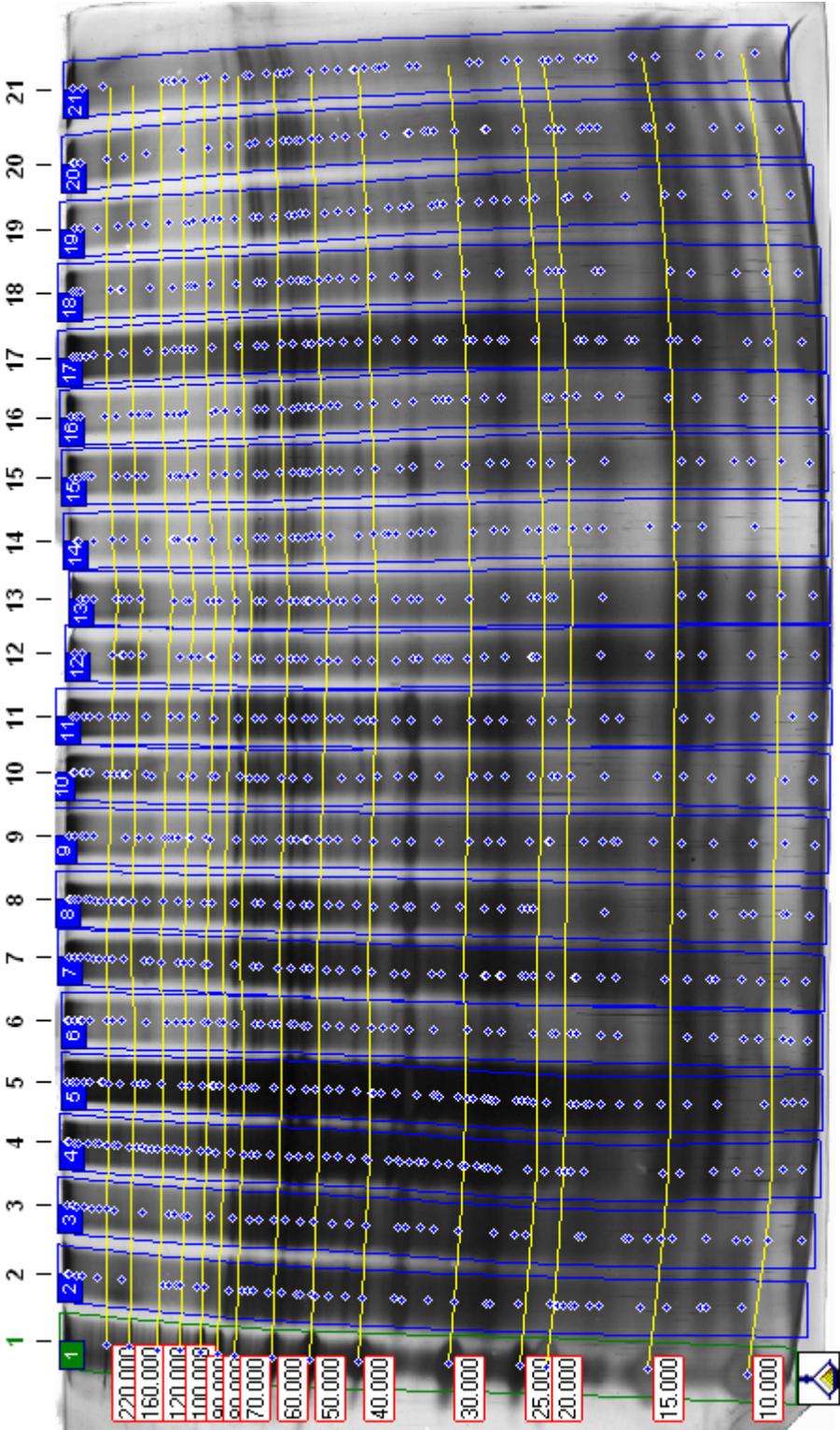
**Gel 04:**  
**Proband 2**  
**3 Minuten**



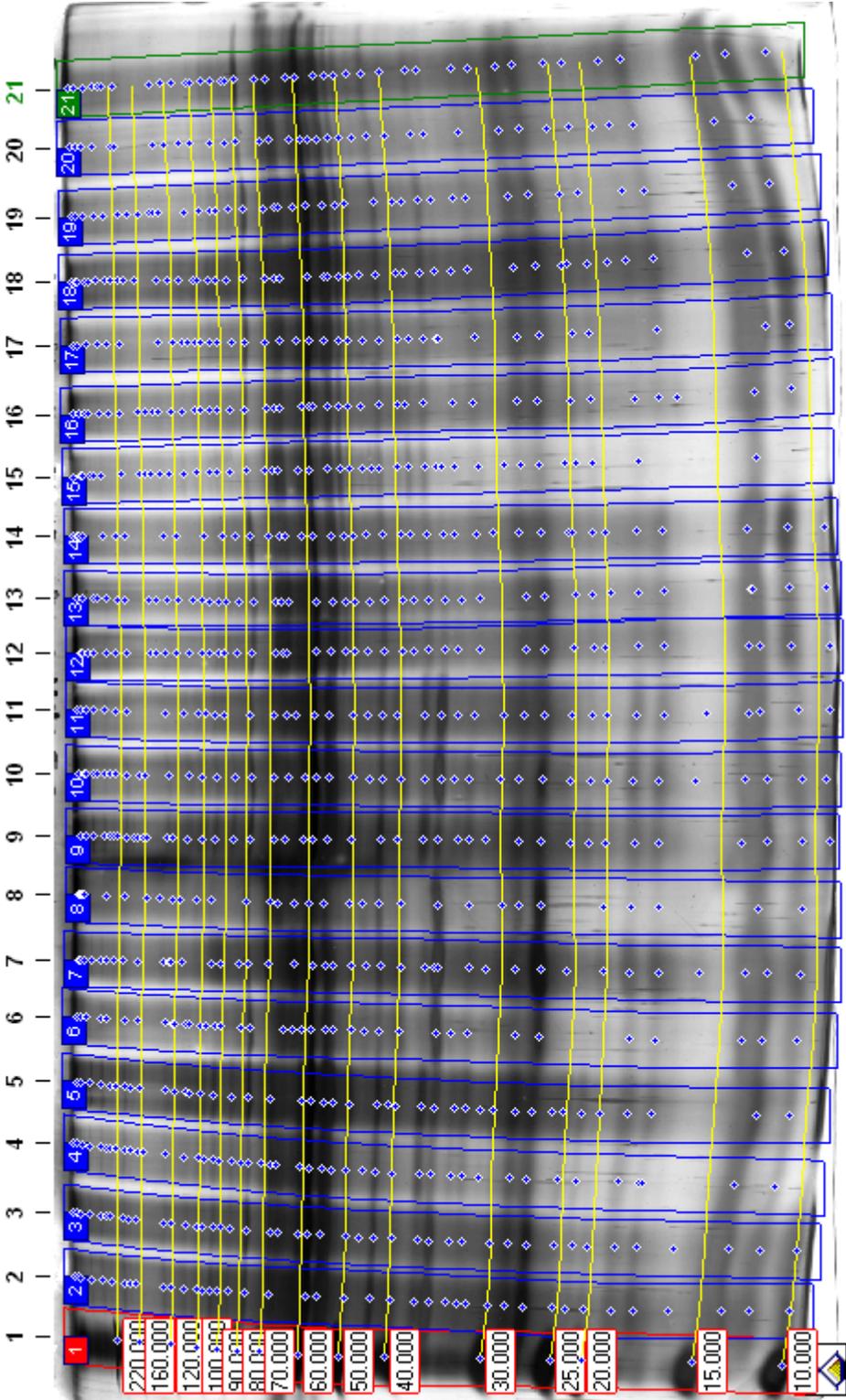
**Gel 05:  
Proband 2  
30 Minuten**



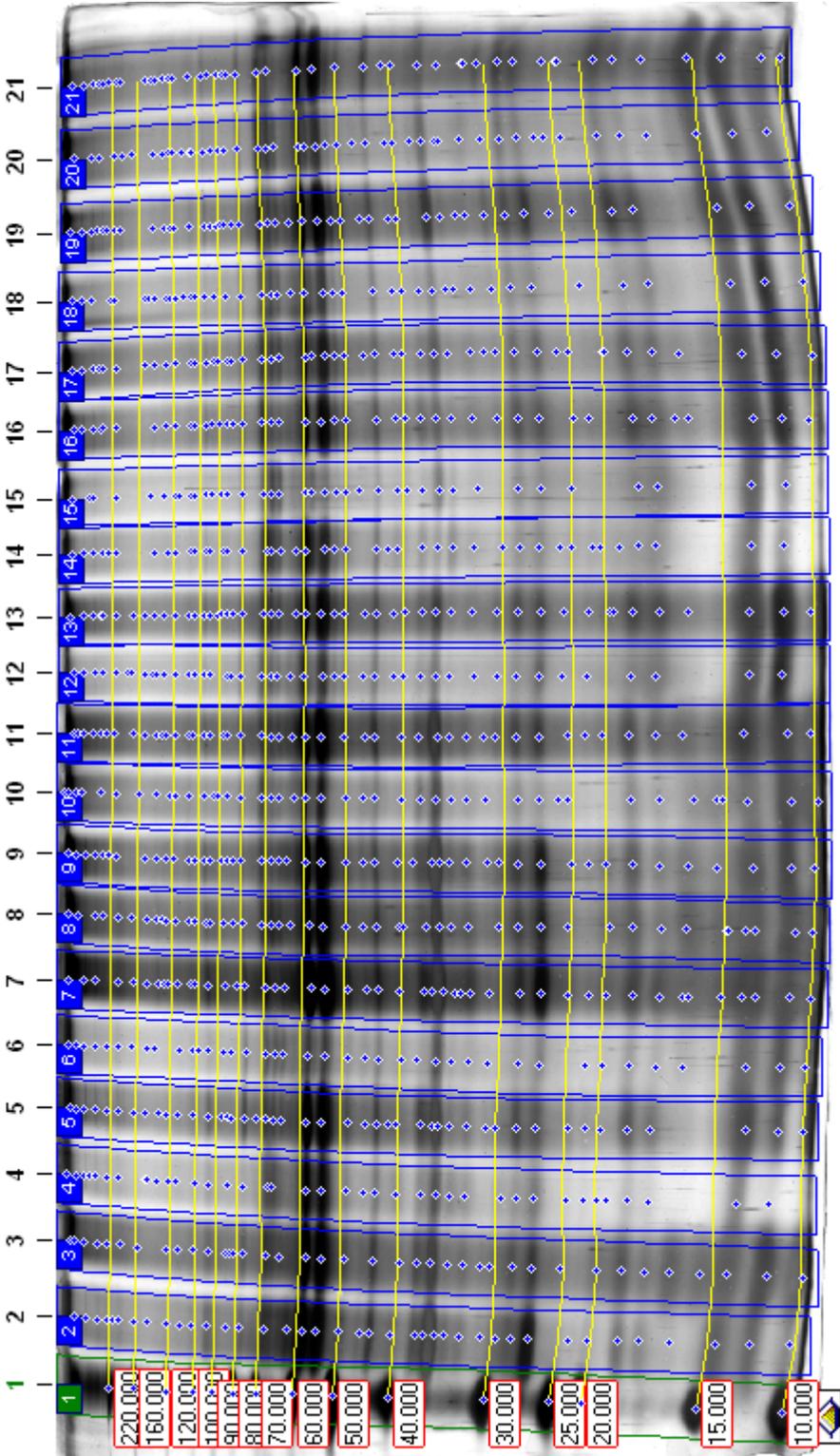
**Gel 06:**  
**Proband 2**  
**120 Minuten**



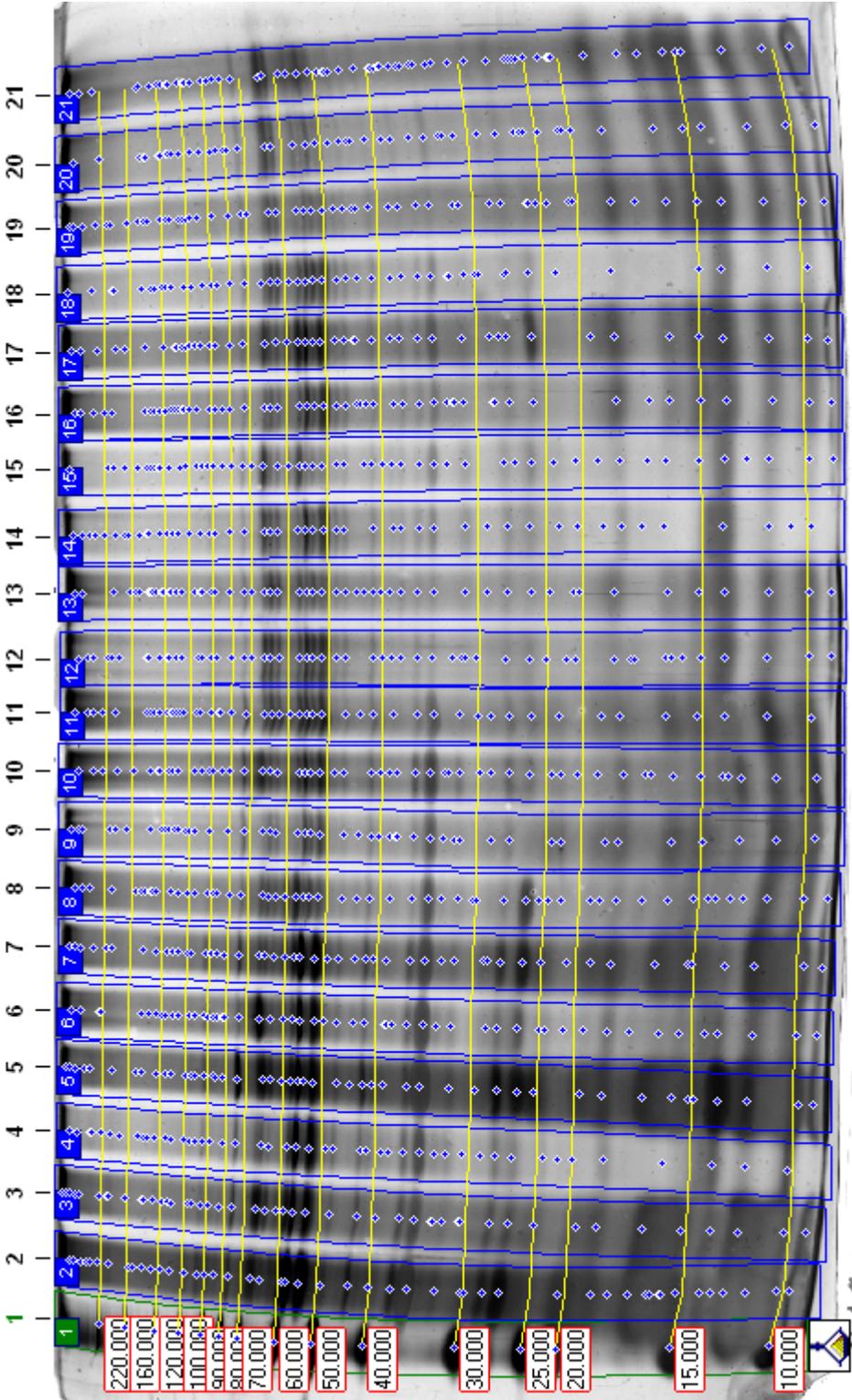
**Gel 07:**  
**Proband 3**  
**3 Minuten**



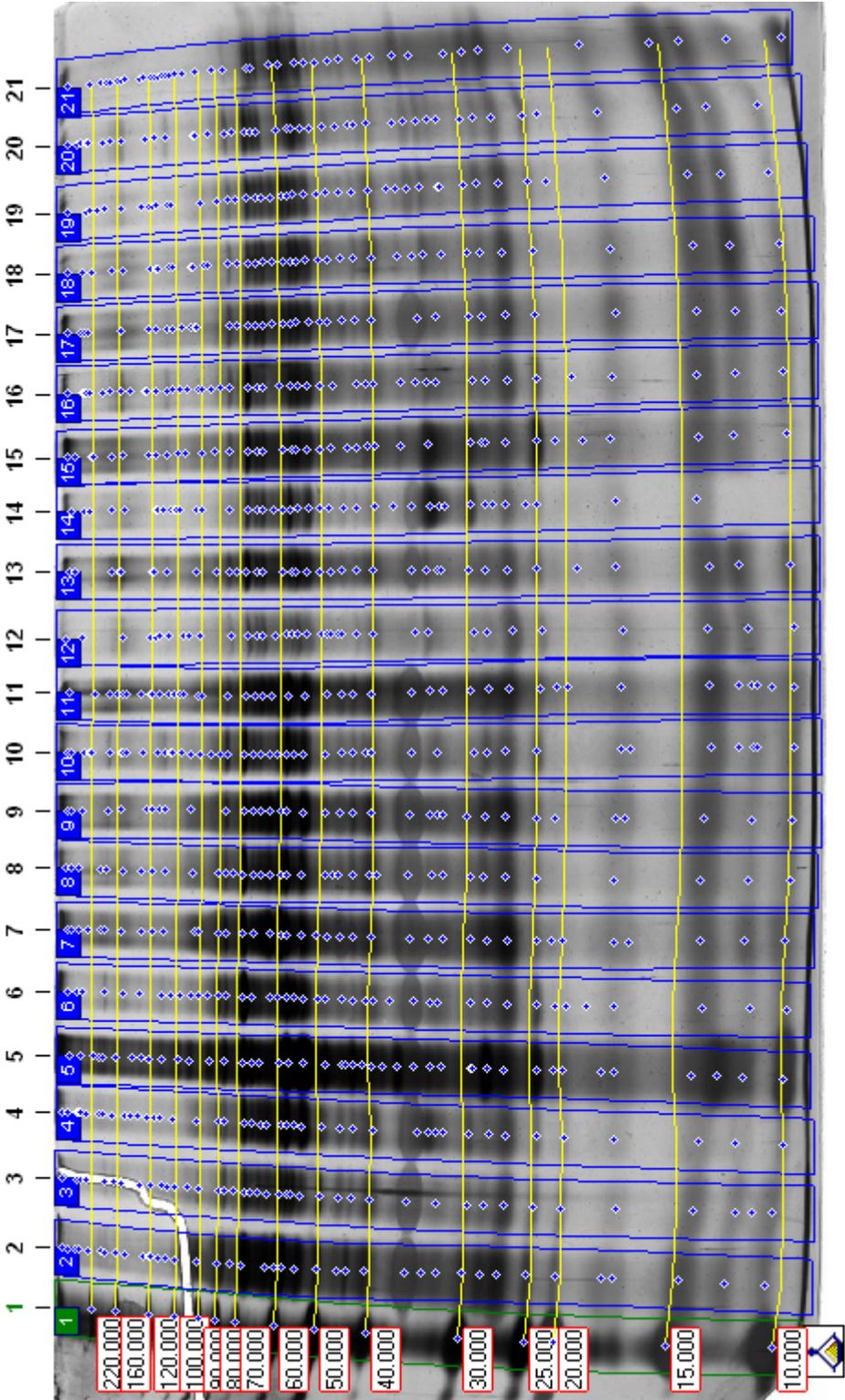
**Gel 08:  
Proband 3  
30 Minuten**



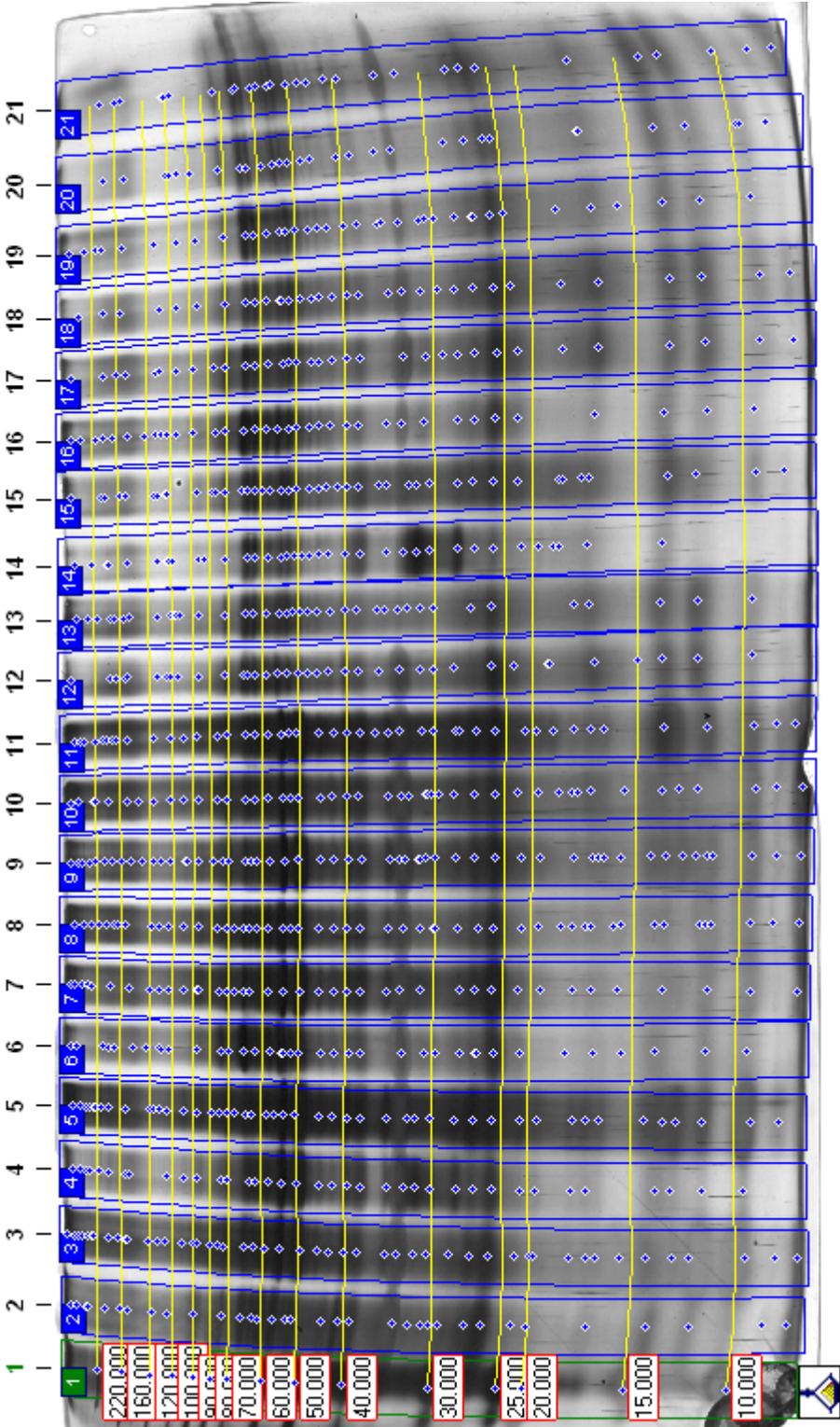
**Gel 09:**  
**Proband 3**  
**120 Minuten**



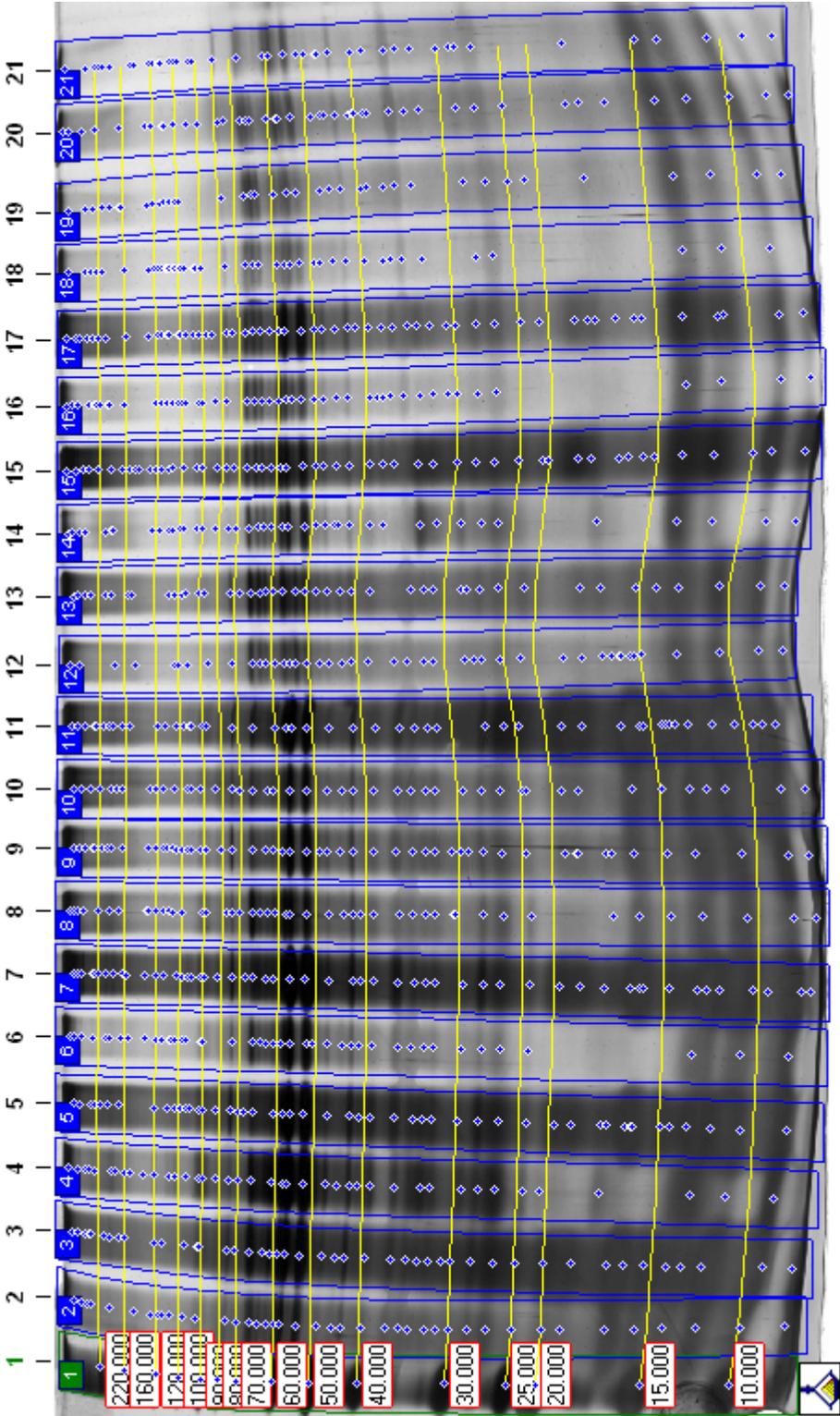
**Gel 10:**  
**Proband 4**  
**3 Minuten**



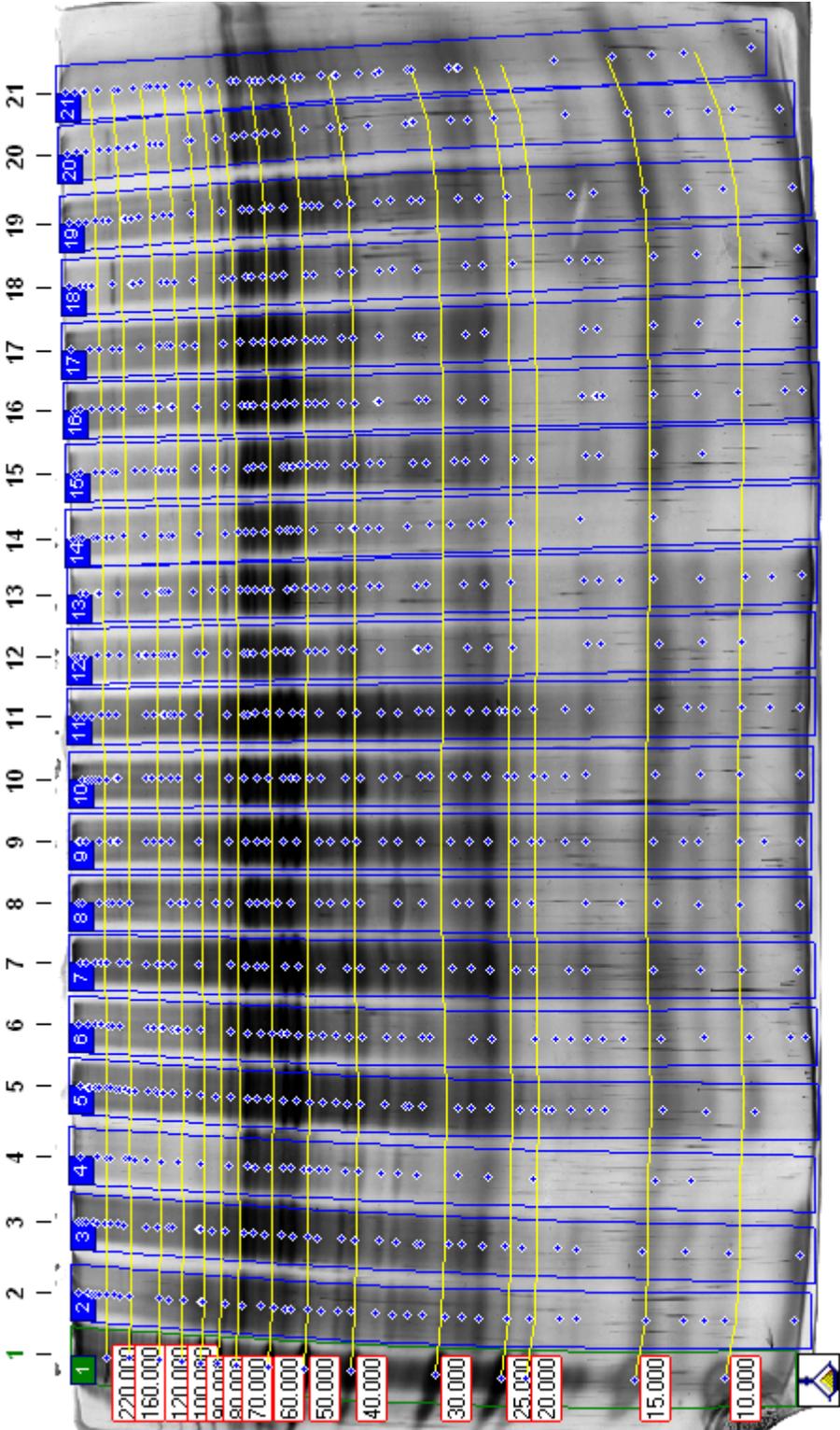
**Gel 11:**  
**Proband 4**  
**30 Minuten**



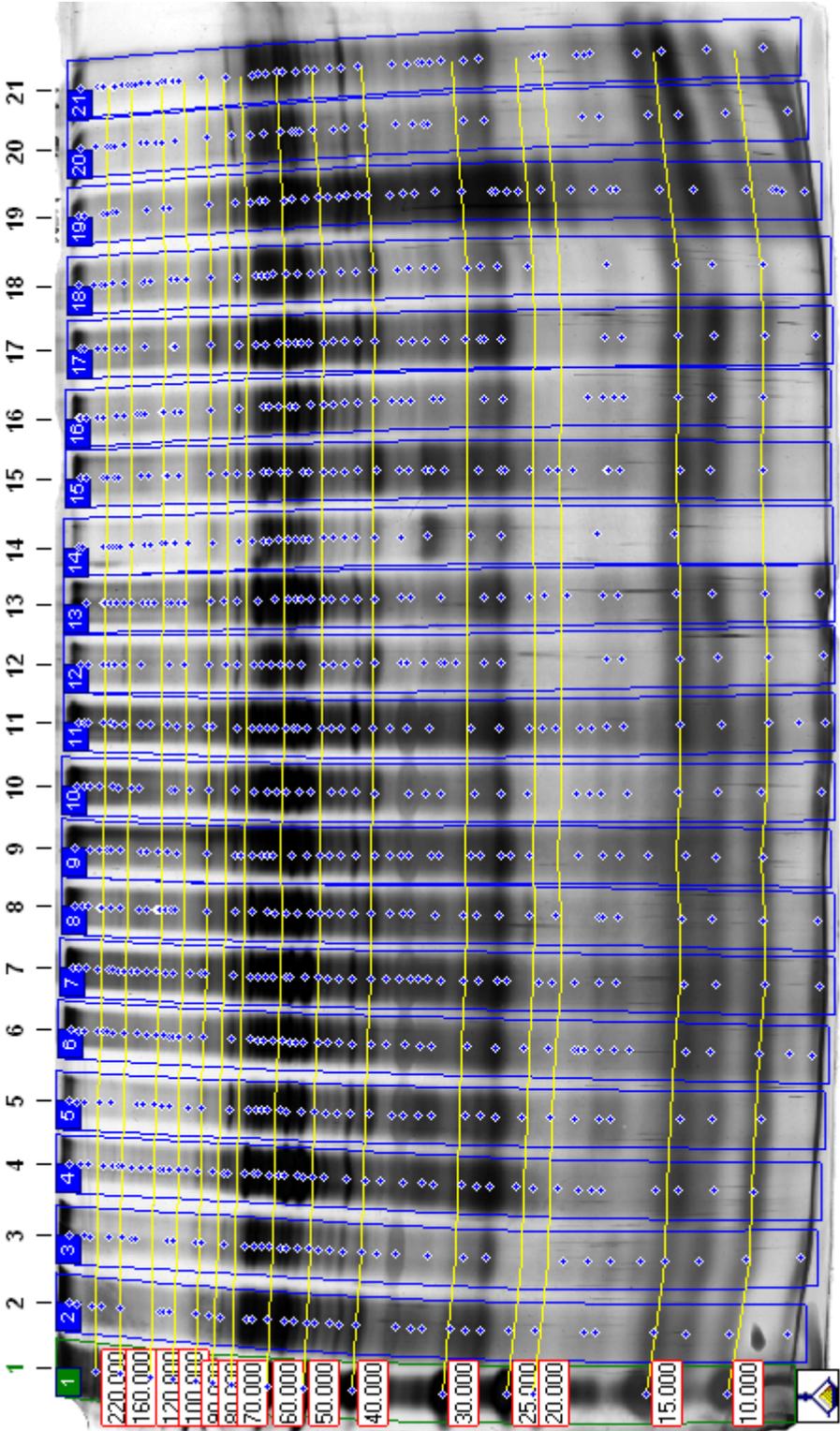
**Gel 12:**  
**Proband 4**  
**120 Minuten**



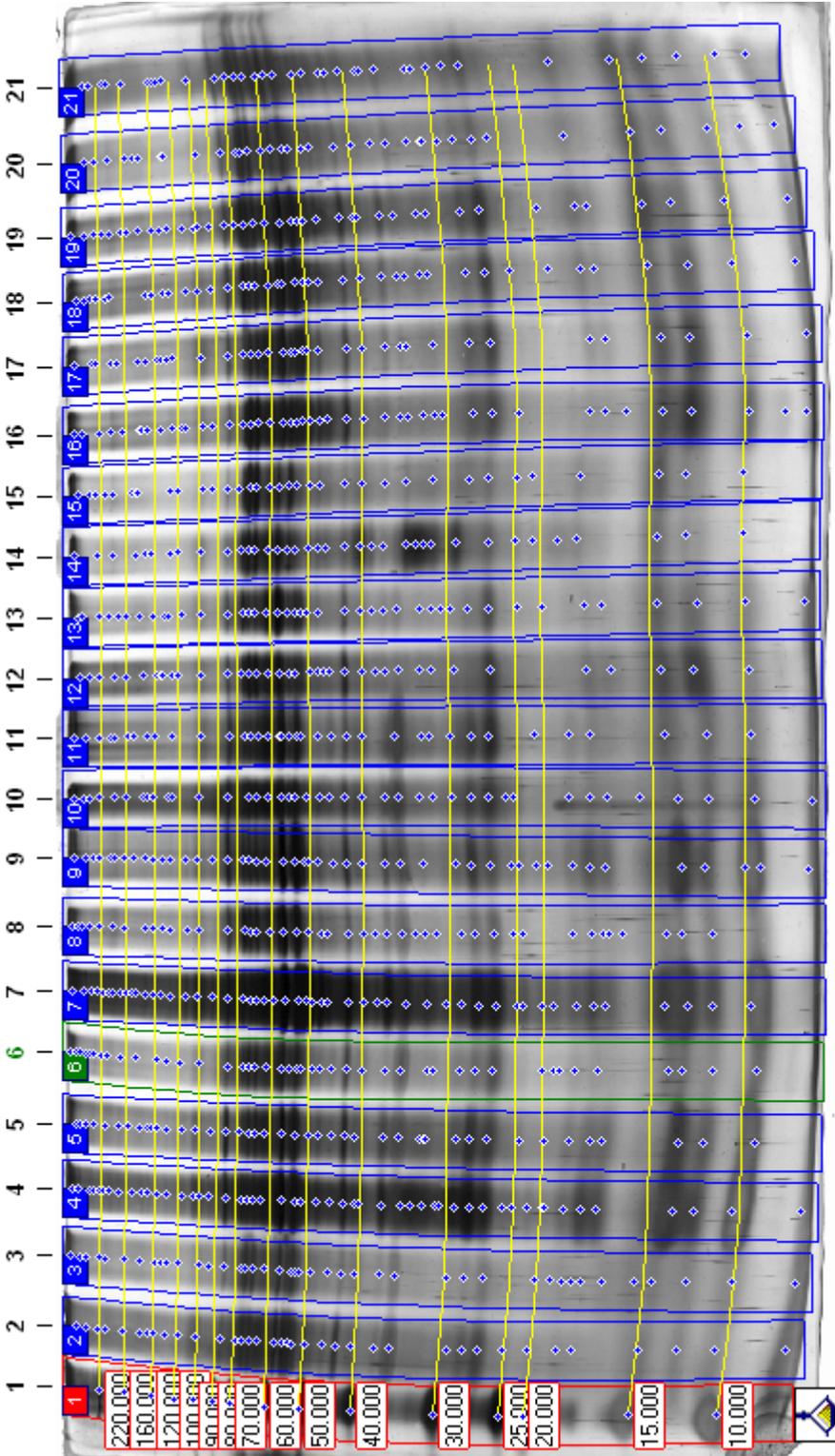
**Gel 13:**  
**Proband 5**  
**3 Minuten**



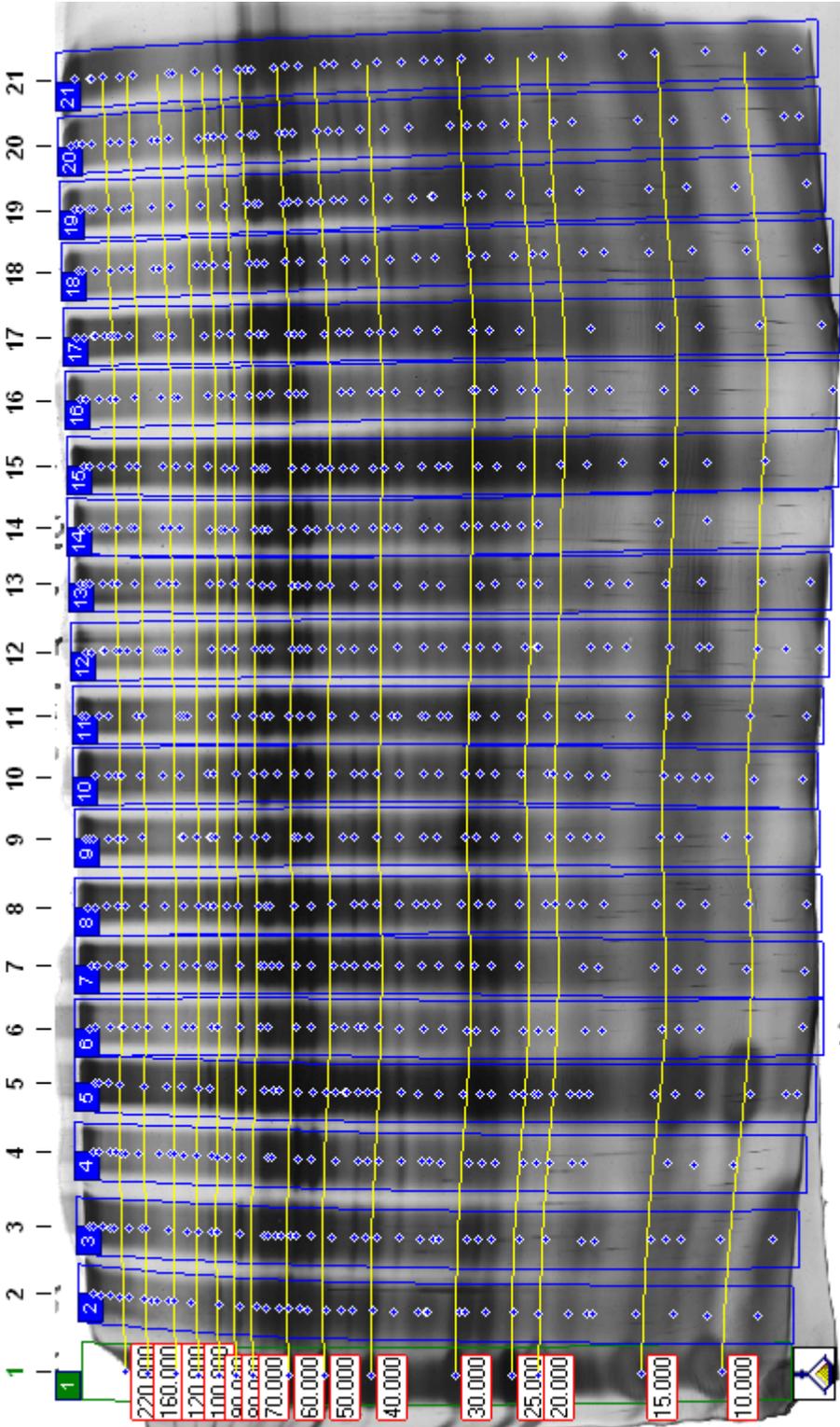
**Gel 14:**  
**Proband 5**  
**30 Minuten**



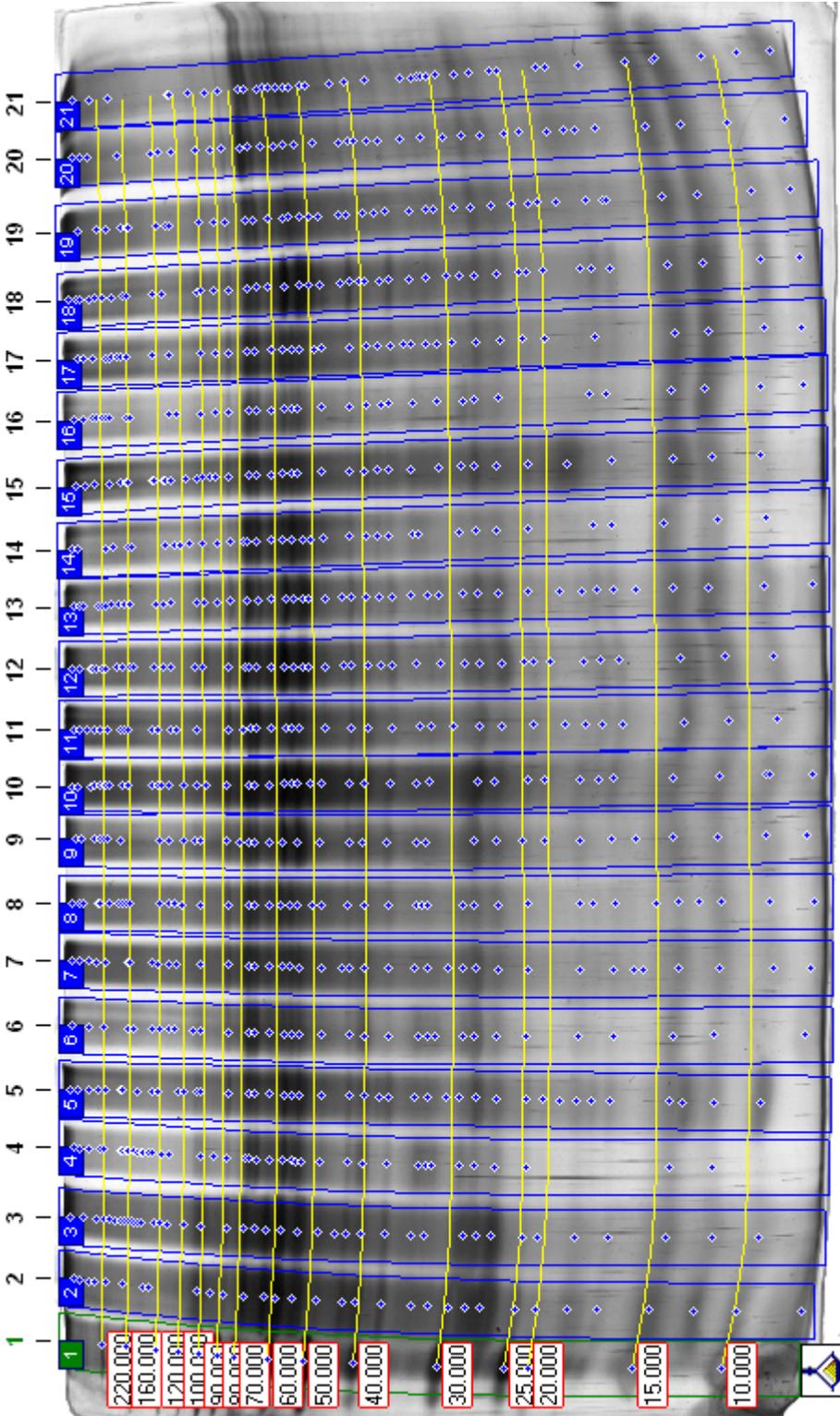
**Gel 15:**  
**Proband 5**  
**120 Minuten**



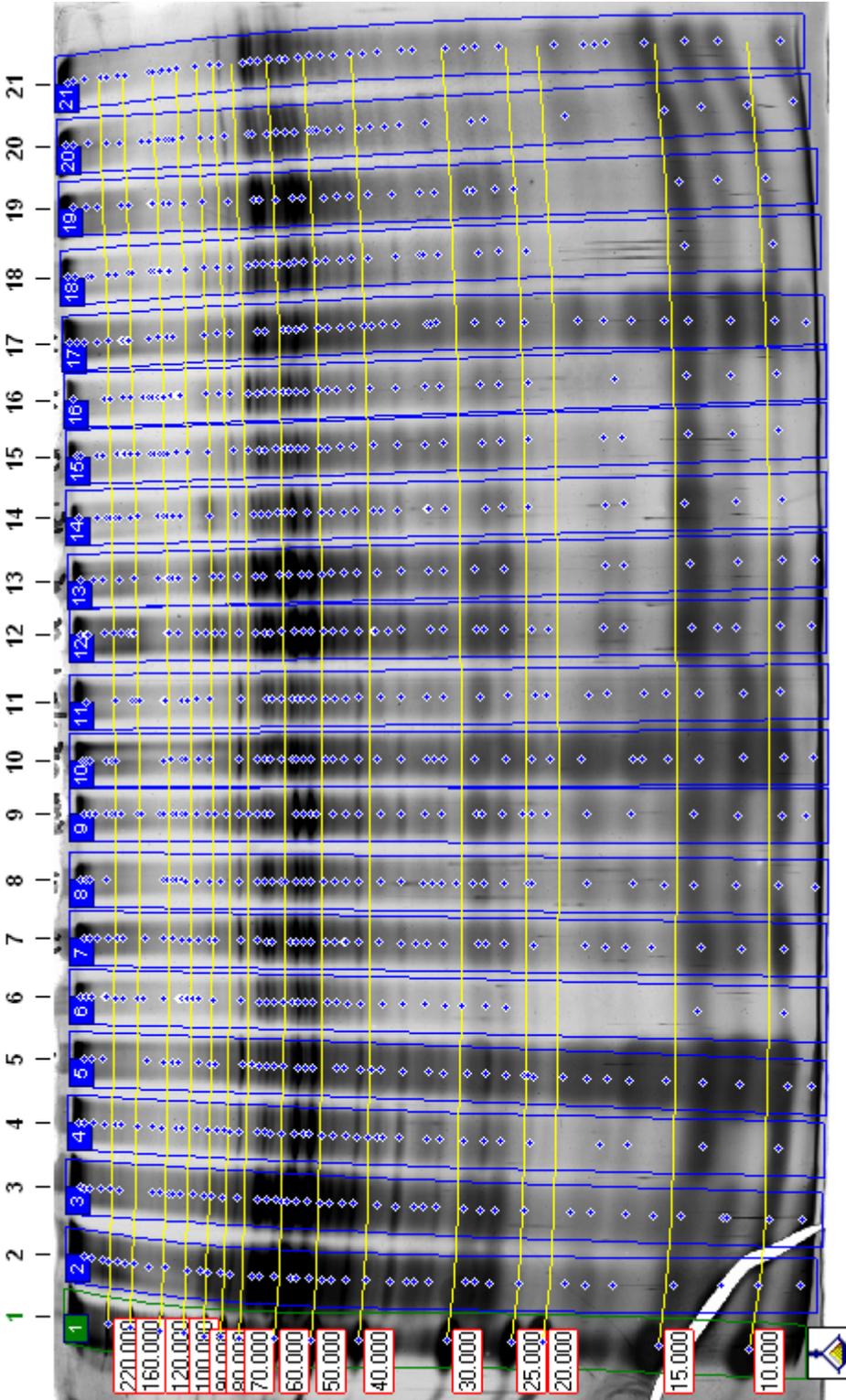
**Gel 16:**  
**Proband 6**  
**3 Minuten**



**Gel 17:**  
**Proband 6**  
**30 Minuten**

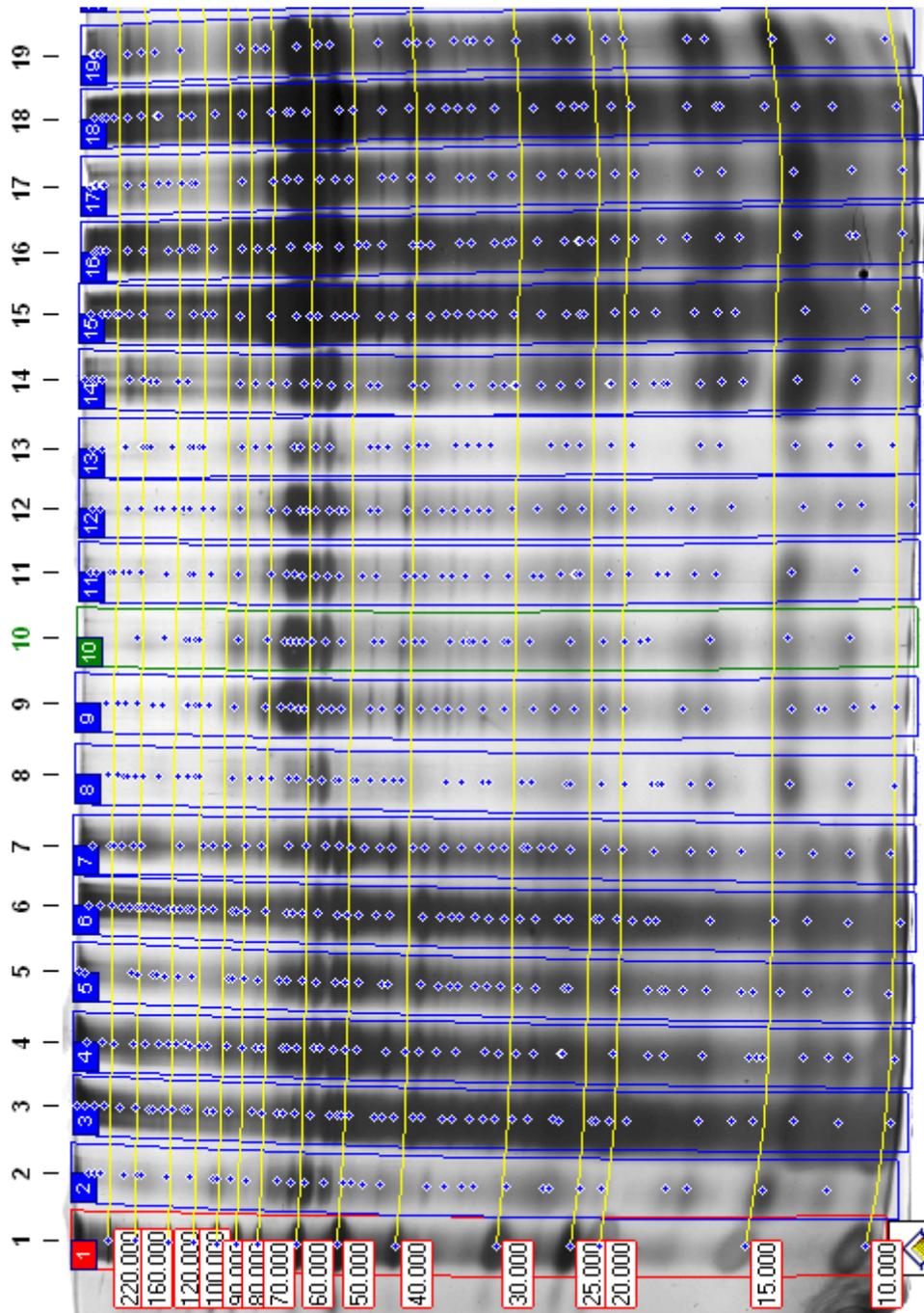


**Gel 18:**  
**Proband 6**  
**120 Minuten**



**Gel 19:  
Speichelproben aller Probanden**

Gescanntes Elektrophoresegel mit den aufgetrennten Proteinbanden der Vollspeichelproben aller 6 Probanden. Spur 1 ist der Bench-Marker (10-220 kDa), Spur 2 -7 Speichelproben pur Probanden 1 – 6, Spur 8 – 13 ultrazentrifugierte Speichelproben Probanden 1 – 6, Spur 14 – 19 ultrazentrifugierte und TCA-gefällte Proben Probanden 1 – 6. Detektierte Banden der Analysesoftware.



## Aufklärungsbogen für Probanden

### Studientitel:

**Elektrophoretische Untersuchungen der Speichelproteinadsorption (und initialen Biofilmbildung) auf Festkörperoberflächen in der Mundhöhle**

### Zusammenfassung:

In dem beantragten Vorhaben soll die initiale Biofilmbildung auf verschiedenen dentalen Restaurationsmaterialien mit biochemischen Methoden charakterisiert werden um zu evaluieren, inwieweit werkstoffspezifische materialabhängige Parameter die intraorale Proteinadsorption auf Fremdkörperoberflächen determinieren.

### Anforderungen an den Proband:

An der Studie können gesunde Erwachsene teilnehmen. Alkohol- und Nikotinabusus, Medikamenteneinnahme sowie spezielle Ernährungsgewohnheiten der Probanden werden ausgeschlossen.

Erkrankungen der Speicheldrüsen oder allgemeine Leiden, die mit einem veränderten Speichelfluss einhergehen liegen nicht vor.

Die Mundschleimhäute sind unauffällig.

Sämtliche Probanden sind vollbezahnt. Die Zähne können konservierend versorgt sein. Unversorgte kariöse Defekte, insuffiziente Restaurationen oder Entzündungen des marginalen Parodonts dürfen nicht bestehen.

Die Probanden sollten keine erhöhte Neigung zur Zahnsteinbildung zeigen.

Zur Eignungsfeststellung werden auf Minioplastschienen montierte Rinderschmelzproben über zwei Stunden getragen, anschließend wird die gebildete Pellikelschichtdicke elektronenmikroskopisch untersucht.

### Ablauf der Studie:

Der Proband trägt dreißig partielle Minioplastschienen mit verschiedenen Materialprüfkörpern im Seitenzahnbereich für die Zeiträume von 3 min, 30 min und 2 Stunden in ca. 7 Sitzungen.

Die Prüfkörper werden aus 10 verschiedenen Werkstoffen hergestellt: Amalgam, Goldgusslegierung, Titan, Keramik, Glas, Glas-Polyalkenoat-Zement Ketac Fil, polymere Werkstoffe (Komposit, Teflon, Prothesenkunststoff) und Rinderzahnschmelz.

***30 min vor dem Einsetzen der Schienen erfolgt eine intensive Zahnreinigung durch den Probanden selbst unter Verwendung von Zahnbürste, Zahnseide und ggf. Interdentalbürstchen.***

***Zahncreme und Spüllösungen dürfen nicht benutzt werden! Anschließend wird die Mundhöhle 3 x mit Wasser ausgespült.***

Von diesem Zeitpunkt an, sowie während der gesamten intraoralen Verweilzeit herrscht absolute Nahrungskarenz!

Das Kauen von Kaugummi oder Lutschen von Bonbons etc. ist streng untersagt. Ebenso unterbleibt die Einnahme von Getränken oder anderen Flüssigkeiten!

Mundspüllösungen und Maßnahmen der Mundhygiene sind während der intraoralen Expositionsphase der Probekörper ebenfalls nicht erlaubt.

Das Tragen der Minioplastschienen mit den montierten Prüfkörpern und die Exposition der Prüfkörper in der Mundhöhle stellen für den Probanden kein gesundheitliches Risiko dar. Die Schiene irritiert weder das marginale Parodont noch die Okklusion im Schlussbiss und lässt die palatinale Schleimhaut unbedeckt. Das Risiko des Verschluckens oder Aspirierens der Prüfkörpertrageschiene oder der Prüfkörper wird durch sorgfältige Montage der Proben an den Schienen mit Komposit und die exakte zahntechnische Herstellung der Trageschienen auf ein Minimum reduziert.

Die zur Herstellung der Schienen und zur Befestigung der Prüfkörper eingesetzten Werkstoffe sowie die zur Herstellung der Prüfkörper selbst sind gebräuchliche und für intraorale restaurative zahnärztliche Maßnahmen zugelassene Materialien. Die Schmelzproben stammen von extrahierten Frontzähnen frischgeschlachteter gesunder Jungrinder.

## **Einverständniserklärung**

**zur freiwilligen Teilnahme an der klinisch-experimentellen Studie**

### **„Elektrophoretische Untersuchungen der Speichelproteinadsorption (und initialen Biofilmbildung) auf Festkörperoberflächen in der Mundhöhle“**

**Name des Probanden:**

**Geburtsdatum:**

1. Herr ZA Mario Weyland hat mich vollständig über den Inhalt und die Bedeutung der Studie, insbes. über mögliche Risiken aufgeklärt.
2. Ich hatte die Möglichkeit Fragen zur Studie und zu deren Ablauf zu stellen.
3. Ich bin darüber informiert worden, dass die Auflagen des Datenschutzgesetzes bei der Durchführung und Dokumentation der Studie eingehalten werden.
4. Ich bin gesund und erkläre mich einverstanden, an der vorgenannten Studie freiwillig teilzunehmen. Ich behalte mir vor, meine Mitwirkung an dieser Studie jederzeit auch ohne Angabe von Gründen zu beenden.
5. Ich erkenne die beschriebenen Bedingungen zu dieser Studie an und werde mich an die Vorgaben zu deren Ablauf halten.

**Ort, Datum :** Homburg, .....

**Unterschrift Proband:**.....

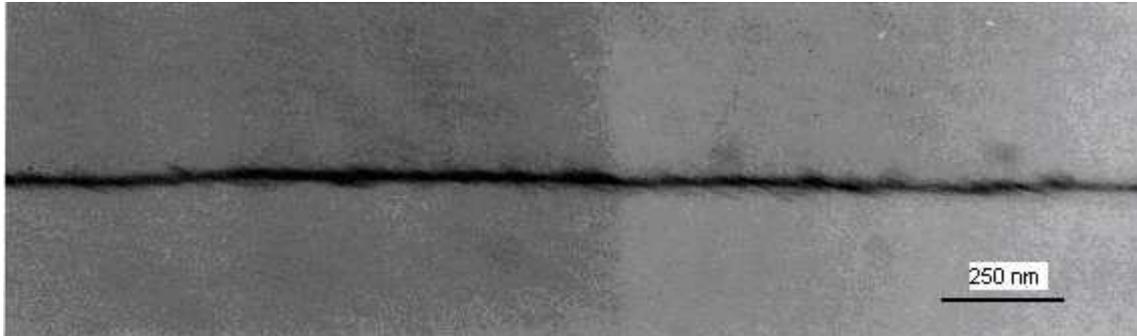
**Ort, Datum :** Homburg, .....

**Unterschrift Studienleiter:**.....

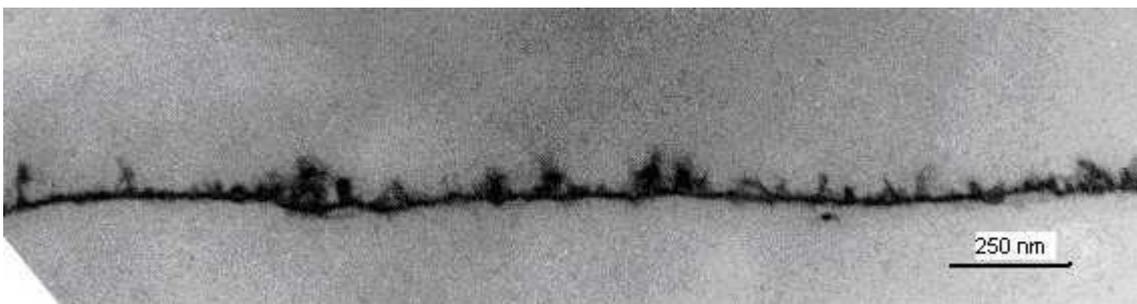


## TEM-Bildersammlung

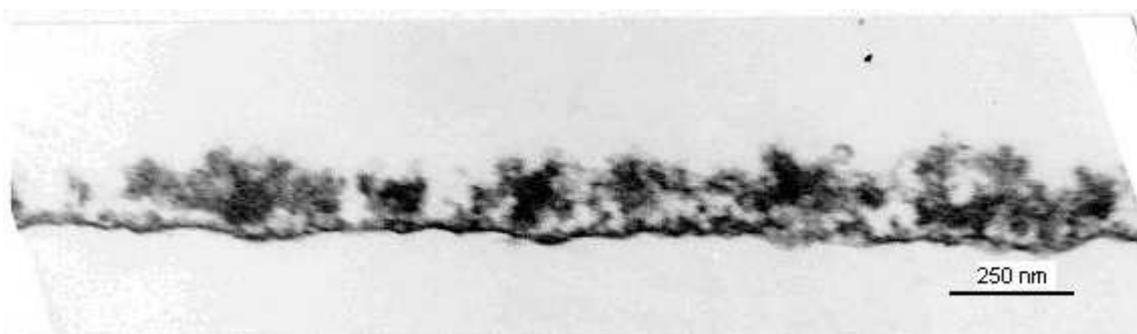
Transmissionselektronenmikroskopische Bilder bei 30.000facher Vergrößerung



Pellikel **3 Minuten** Oberkiefer Seitenzahnggebiet (**bukkal**), Dicke ca. 17 nm

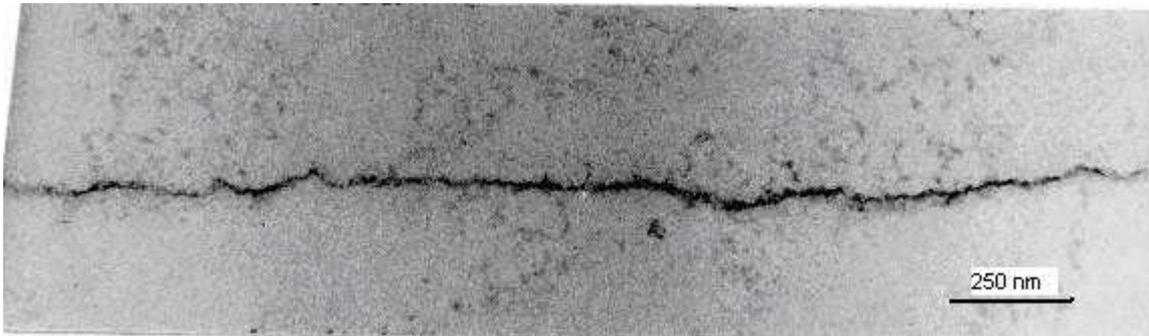


Pellikel **30 Minuten** Oberkiefer Seitenzahnggebiet (**bukkal**), Dicke ca. 33-66 nm  
(100-165 nm)

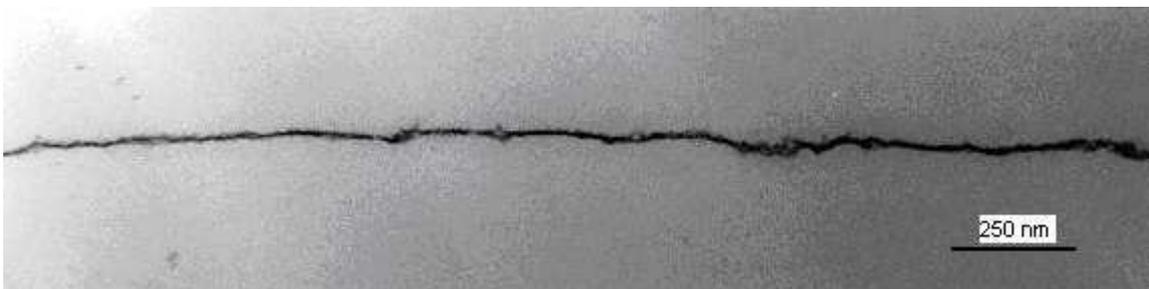


Pellikel **2 Stunden** Oberkiefer Seitenzahnggebiet (**bukkal**), Dicke ca. 165-495 nm  
(66-660 nm)

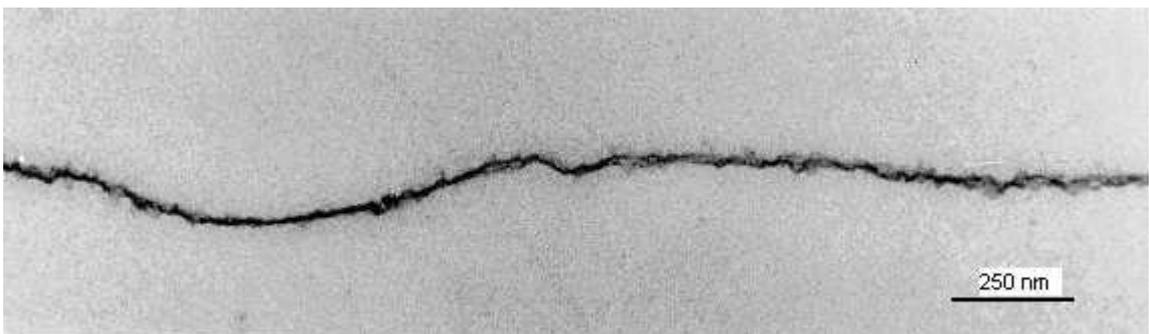
**Transmissionselektronenmikroskopische Bilder bei 30.000facher Vergrößerung**



Pellikel **3 Minuten** Oberkiefer Seitenzahnggebiet (**palatinal**), Dicke ca. 3 nm



Pellikel **30 Minuten** Oberkiefer Seitenzahnggebiet (**palatinal**), Dicke ca. 7-17 nm



Pellikel **120 Minuten** Oberkiefer Seitenzahnggebiet (**palatinal**), Dicke ca. 17 nm

TEM-Bilder von Frau W. Hoth-Hannig  
Proband M. Weyland



Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Püttlingen, den

Unterschrift des Promovierenden:

(Weyland, Mario)

Stempel / Unterschrift des an Eides statt aufnehmenden Beamten:.....

## **Publikation**

Es ist geplant, die hier vorliegende Arbeit unter: Weyland M, Jung M, Zimmermann R, Feldmann U, Gräber S, Hannig M: "Biochemical analyses of salivary pellicles formed in situ on different materials,, in der Zeitschrift „Biomaterials“ zu veröffentlichen.